

Neue Liganden an humanen Dopamin- und Serotoninrezeptoren – Assay Entwicklung und Struktur-Wirkungs-Beziehungen

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von
Apothekerin Franziska Katrin Ursula Müller

geboren am 29. November 1978
in Jena

Gutachter:

1. Prof. Dr. Jochen Lehmann, Jena
2. PD Dr. Michael Decker, Regensburg
3. Prof. Dr. Gerd Bendas, Bonn

Tag der öffentlichen Verteidigung: 10. August 2010

DANKSAGUNG

Die praktischen Arbeiten zu der vorliegenden Dissertation wurden im Zeitraum von September 2005 bis September 2009 am Lehrstuhl für pharmazeutische und medizinische Chemie der Friedrich-Schiller-Universität Jena durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Lehmann, welcher mir die Arbeit auf diesem interessanten Gebiet ermöglichte und der mit seiner freundlichen, humorvollen und stets diskussionsbereiten Art für eine angenehme und kreative Arbeitsatmosphäre sorgte.

Allen Kooperationspartnern, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich ebenfalls danken und an entsprechender Stelle auf sie verweisen.

Von Herzen danken möchte ich auch allen Kollegen, die durch ihre offene, hilfsbereite und freundschaftliche Art dazu beitrugen, die Promotionszeit zu einem unvergesslichen Lebensabschnitt voller wertvoller Erinnerungen werden zu lassen. Besonders erwähnen möchte ich in diesem Zusammenhang Dr. Yvonne Rook, Dr. Jörg Konter und Dr. Andreas König, in deren Gesellschaft sich die Promotionszeit auch außerhalb der Arbeitszeit sehr angenehm gestaltete, sowie Dr. Christoph Enzensperger, der mich des Öfteren an seinem unerschöpflichen Ideenreichtum teilhaben ließ, und Carolin Roegler, die mir bei Layout- und Formatierungsfragen mit hilfreichen Vorschlägen zur Seite stand.

Bei PD Dr. Michael Decker möchte ich mich für sein stets offenes Ohr bei pharmakologischen Fragestellungen sowie die kritische Durchsicht des Manuskriptes und die damit verbunden Anregungen bedanken.

Mein Dank gilt auch allen technischen Mitarbeitern des Institutes. Besonders erwähnt seien hier: Heidi Traber für ihr Engagement in der Zellkultur und bei der Durchführung des Calcium Assays, Bärbel Schmalwasser und Petra Wiecha für Unterstützung bei der Gewinnung der umfangreichen Radioligandbindungsdaten, und Uwe Beck, der bei technischen Problemen und dramatischen Ameisenplagen stets umgehend zur Stelle war.

Mein größter Dank gilt jedoch meinen Eltern und Großeltern, die mich in jeder Hinsicht auf meinem bisherigen Lebensweg unterstützt und gefördert haben, und meinem lieben Freund Christian für seine Ruhe und Geduld, sowie seine liebevolle Unterstützung.

A	EINLEITUNG	1
A.1	Dopamin und Serotonin.....	1
A.1.1	Dopaminrezeptoren	2
A.1.2	Serotoninrezeptoren	4
A.1.3	Neuronale Serotonin-Dopamin Interaktion.....	6
A.1.4	Wirkung atypischer Neuroleptika auf das Serotonin- und Dopaminsystem – die „Serotonin-Dopamin“-Hypothese.....	7
A.2	Entwicklung neuer Liganden als pharmakologische Werkzeuge oder potentielle Arzneistoffe.....	9
A.2.1	Diarylazecine und deren ringerweiterte Homologe	9
A.2.2	Arylpiperazinderivate	13
A.2.3	Apomorphinderivate	14
A.3	Zielstellung der Arbeit.....	17
A.3.1	Assay Entwicklung.....	17
A.3.1.1	Etablierung eines fluoreszenzbasierten funktionellen Calcium Assays mit HEK D ₃ Zellen.....	17
A.3.1.2	Charakterisierung von HEK D ₂ und D ₃ Zelllinien für Radioligandbindungsexperimente zum Ersatz von CHO D ₂ und D ₃ Zelllinien.....	17
A.3.1.3	Charakterisierung HEK 5-HT _{2A} Zellen und Etablierung von Radioligandbindungsexperimenten am 5-HT _{2A} Rezeptor.....	18
A.3.1.4	Versuch der Etablierung eines funktionellen Calcium Assays mit 5-HT _{2A} Zellen.....	18
A.3.2	Untersuchung von Azecinen und Homoazecinen und Synthese von Oxazacycloundecanen	18
A.3.3	Untersuchung von Arylpiperazinderivaten.....	18
A.3.4	Bindungsstudien mit Apomorphinderivaten.....	19
B	ALLGEMEINER TEIL	20
B.1	Azecine und Homoazecine	20
B.1.1	Synthese von 8-Methyl-7,8,9,10,15,16-hexahydro-6 <i>H</i> -indolo[3,2- <i>g</i>][1,4]benz-oxazacycloundecan	21
B.1.2	Versuche zur Synthese von 12-Methoxy-8-methyl-6,7,8,9,10,15-hexahydrodibenzo[<i>g</i> , <i>j</i>][1,4]oxazacycloundecan	22
B.1.3	Versuche zur Synthese von 8-Methyl-6,7,8,9,10,15-hexahydrodibenzo[<i>g</i> , <i>j</i>]-[1,4]oxazacycloundecan-12-ol.....	24
B.2	Arylpiperazine.....	26
B.2.1	Arylpiperazinderivate mit Lactamfunktion.....	26
B.2.1.1	2-[4-(4-Phenylpiperazin-1-yl)butyl]-2,3-dihydro-1,2-benzisothiazol-1,1-dioxide und -phthalazin-1(2 <i>H</i>)-one.....	27

B.2.1.2	2-[4-(4-Phenylpiperazin-1-yl)butyl]-2,3-dihydro-1,2-benzisothiazol-3(2 <i>H</i>)-1,1-dioxide, -chinazolin-4(3 <i>H</i>)-one, und -1,3-dihydro-2 <i>H</i> -indol-2-one.....	28
B.2.1.3	2-[4-(4-Phenylpiperazin-1-yl)butyl]-isoindolin-1-one.....	28
B.2.2	Weitere Arylpiperazine	29
B.2.2.1	<i>N</i> -(1,3-Benzothiazol-2-yl)-2-(4-phenylpiperazin-1-yl)acetamide	29
B.2.2.2	Thiopropylphenylpiperazine mit verschiedenen bioisosteren Heteroaromaten	30
B.3	Apomorphinderivate	31
B.3.1	Neue heterocyclische Strukturen am Apomorphingrundgerüst	31
B.3.2	2-Hydroxyapomorphine mit Benzylsubstituenten in 1-Stellung.....	32
C	PHARMAKOLOGISCHER TEIL – METHODEN UND MATERIALIEN.....	33
C.1	Zelllinien und Zellkultur	33
C.1.1	Eingesetzte gentechnisch veränderte Organismen	33
C.1.2	Kultur und Vermehrung der Zellen	33
C.1.3	Lagerung der Zelllinien	35
C.2	Radioligandbindungsstudien	36
C.2.1	Theoretische Grundlagen.....	36
C.2.1.1	Das Massenwirkungsgesetz.....	36
C.2.1.2	Sättigungsexperimente.....	37
C.2.1.3	Kompetitive Bindungsexperimente	40
C.2.2	Durchführung der Inhibitionsexperimente	43
C.2.2.1	Herstellung einer Ganzzeilsuspension	43
C.2.2.2	Screening und K_i -Wert Bestimmung.....	44
C.2.2.3	Auswertung der Messergebnisse	46
C.2.3	Etablierung des Radioligandbindungsassays an 5-HT _{2A} Rezeptor exprimierenden Zelllinien und an neuen Dopamin D ₂ und D ₃ Zelllinien.....	47
C.2.3.1	Proteinbestimmung.....	47
C.2.3.2	Bestimmung der K_D -Werte.....	48
C.2.4	Materialien	49
C.2.4.1	Reagenzien und Puffer.....	49
C.2.4.2	Radioliganden.....	50
C.2.4.3	Sonstige Materialien und Geräte	52
C.3	Fluoreszenzbasiertes funktionelles Calcium Assay	53
C.3.1	Theoretische Grundlagen der Calcium-Fluoreszenz-Messung.....	53
C.3.2	Durchführung der Experimente	54
C.3.2.1	Anfärben der Zellen und Herstellung der Zellsuspension	54
C.3.2.2	Bestimmung der funktionellen Aktivität	55
C.3.3	Auswertung der Messergebnisse	57

C.3.4	Etablierung des funktionellen Calcium Assays an 5-HT _{2A} Rezeptor exprimierenden Zelllinien und Dopamin D ₃ Zelllinien.....	57
C.3.5	Materialien	58
C.3.5.1	Reagenzien und Puffer.....	58
C.3.5.2	Standardagonisten	58
C.3.5.3	Fluoreszenzfarbstoff	59
C.3.5.4	Fluoreszenz Microplate Reader.....	59
C.4	Testsubstanzen	60
C.4.1	Azecine und azecinverwandte Verbindungen aus dem Arbeitskreis	60
C.4.2	Arylpiperazinderivate	67
C.4.3	Apomorphinderivate	70
C.4.4	Referenzsubstanzen.....	72
D	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	74
D.1	Etablierung der Radioligandbindungsstudie an 5-HT_{2A}, D₂ und D₃ Rezeptor exprimierenden Zelllinien	74
D.1.1	Charakterisierung der eingesetzten Zelllinien.....	74
D.1.2	Anteil der spezifischen Bindung an der Gesamtbindung	75
D.1.3	Anteil des gebunden Radioliganden an der Gesamtkonzentration.....	75
D.1.4	Beispiel einer Bindungskurve am 5-HT _{2A} Rezeptor	76
D.2	Etablierung des Calcium Assays an 5-HT_{2A} und D₃ Rezeptor exprimierenden Zelllinien	78
D.3	Tabellarische Übersicht der ermittelten Bindungsdaten	79
D.3.1	Azecine und azecinverwandte Substanzen	79
D.3.2	Alkylpiperazinderivate.....	85
D.3.3	Apomorphinderivate	87
D.3.4	Referenzsubstanzen.....	88
D.4	Diskussion der Bindungsdaten	90
D.4.1	Azecine und deren Homologe	90
D.4.1.1	Bindungseigenschaften der Indolderivate im Vergleich zu den Dibenz-derivaten	98
D.4.1.2	Rezeptorselektivität und -subtypselektivität der Diarylazecin-, Diarylundecan- und Diaryldodecanderivate.....	104
D.4.1.3	Untersuchung der Korrelation von 5-HT _{2A} Affinität und Dopaminrezeptor-affinitäten	112
D.4.1.4	Einfluss der Hydroxy- und Methoxysubstitution auf die 5-HT _{2A} , D ₁ und D ₂ Affinitäten.....	113
D.4.1.5	Bindungseigenschaften der Oxazacycloundecane im Vergleich mit den sauerstofffreien Analogen.....	116

D.4.2	Bindungsverhalten rigider Synthesevorstufen ringerweiterter Homologer der Azecine und Affinitäten offenkettiger Analoga mit gesteigerter Flexibilität	117
D.4.3	Arylpiperazinderivate	119
D.4.3.1	Arylpiperazinderivate mit Lactamfunktion.....	119
D.4.3.2	Arylpiperazinderivate mit verkürztem Spacer	121
D.4.3.3	Arylpiperazinderivate ohne Amidfunktion – Ersatz der Amidbrücke durch einen Thiopropylspacer	122
D.4.4	Apomorphinderivate	124
D.4.4.1	Thiazolo- und Isothiazoloderivate.....	124
D.4.4.2	4 <i>H</i> -Thiochromanderivate	125
D.4.4.3	2-Hydroxyapomorphine mit Benzylsubstituenten in 1-Stellung.....	126
E	ZUSAMMENFASSUNG.....	127
E.1	Assay Entwicklung.....	127
E.2	Untersuchung von Azecinen und Homoazecinen und Synthese von Oxazacycloundecanen.....	127
E.3	Untersuchung von Arylpiperazinderivaten.....	129
E.4	Bindungsstudien mit Apomorphinderivaten	130
F	SUMMARY	131
F.1	Assay development.....	131
F.2	Studies on azecines and homoazecines and the synthesis of oxacyclo-undecenes ...	131
F.3	Studies on arylpiperazine derivatives	133
F.4	Binding studies on apomorphine derivatives	134
G	EXPERIMENTELLER TEIL – SYNTHESEN	135
G.1	Allgemeine Angaben zu Materialien und Geräten.....	135
G.2	Monographien.....	136
G.2.1	2-(2-Hydroxyethoxy)- <i>N</i> -[2-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)ethyl]benzamid (FM1).....	136
G.2.2	6,7,9,10,15,15 <i>b</i> -Hexahydroindolo[2',3':3,4]pyrido[1,2- <i>d</i>][1,4]benzoxazepin-hydrochlorid (FM5)	137
G.2.3	8-Methyl-6,7,9,10,15,15 <i>b</i> -hexahydroindolo[2',3':3,4]pyrido[1,2- <i>d</i>][1,4]benzoxazepin-8-iumiodid (FM6).....	138
G.2.4	8-Methyl-7,8,9,10,15,16-hexahydro-6 <i>H</i> -indolo[3,2- <i>g</i>][1,4]benzoxaza-cycloundecan (FM7)	138
G.2.5	2-(2-Hydroxyethoxy)- <i>N</i> -[2-(3-methoxyphenyl)ethyl]benzamid (FM9).....	139

G.2.6	12-Methoxy-6,7,10,14b-tetrahydro-9 <i>H</i> -isochino[2,1- <i>d</i>][1,4]benzoxazepin-hydrochlorid (FM10)	141
G.2.7	Ethyl-12-methoxy-6,7,10,15-tetrahydrodibenzo[<i>g,j</i>][1,4]oxa- cycloundecan-8(9 <i>H</i>)carboxylat (FM13)	142
G.2.8	3-Benzylloxynitrostyren (FM2)	143
G.2.9	2-[3-(Benzylloxy)phenyl]ethylamin (FM3).....	143
G.2.10	<i>N</i> -{2-[3-(Benzylloxy)phenyl]ethyl}-2-(2-hydroxyethoxy)benzamid (FM14)	144
G.2.11	2-{2-[(2-[3-(Benzylloxy)phenyl]ethyl)amino]carbonyl}phenoxy}ethyl-ethylcarbonat (FM28)	145
G.2.12	2-{2-[6-(Benzylloxy)-3,4-dihydroisochinolin-1-yl]phenoxy}ethyl-ethylcarbonat- hydrochlorid (FM29)	146
G.2.13	2-{2-[6-(Benzylloxy)-3,4-dihydroisochinolin-1-yl]phenoxy}ethanol-hydrochlorid (FM30)	147
H	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	148
I	LITERATURVERZEICHNIS.....	149
	PUBLIKATIONSVERZEICHNIS	
	SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	
	LEBENS LAUF	
	ANHANG	

A EINLEITUNG

Das zentrale Serotonin und Dopamin System ist von großer Bedeutung für die Regulation normaler und pathologischer physiologischer Funktionen. Dysfunktionen der serotonergen und dopaminergen Neurotransmission sind an der Pathophysiologie verschiedener neuropsychiatrischer Erkrankungen wie Schizophrenie, Depression, Suchterkrankungen, Aufmerksamkeits-Defizit Syndrom mit Hyperaktivität (ADHS), Gilles-de-la-Tourette Syndrom sowie des Morbus Parkinson (PD) beteiligt [Koob, 1992; Roth et al., 1992; Brown, Gershon, 1993; Fibiger, 1995; Esposito et al., 2008].

Die Entwicklung rezeptorselektiver Liganden mit agonistischer oder antagonistischer Aktivität ist unerlässlich für die Forschung, um die funktionelle Bedeutung der verschiedenen Rezeptoren und deren Beteiligung an der Pathogenese von Erkrankungen festzustellen („molecular tools“). Besonders bei Erkrankungen, für die gegenwärtig keine zufriedenstellende, z.B. nebenwirkungsarme, Therapie verfügbar ist, wie Morbus Parkinson oder Schizophrenie, ist es hilfreich, die Pathophysiologie der Erkrankung und die Wirkmechanismen der Medikamente vollständig aufzuklären, um neue, bessere Therapiemöglichkeiten zu entwickeln. Obwohl hoch Rezeptor- und Rezeptorsubtyp-selektive Liganden wichtige Werkzeuge für die Forschung sind, finden sie selten als Arzneimittel den Weg in die Praxis.

Viele Wissenschaftler tendieren heute eher dazu, dass so genannte „dirty drugs“ oder „multiacting receptor targeted antipsychotics“ (MARTA), insbesondere bei der Behandlung von Psychosen, gegenüber den rezeptorselektiven Verbindungen von Vorteil sind [Meltzer, 2004; Roth et al., 2004; Horacek et al., 2006]. Zur Entwicklung solcher multi-affiner Verbindungen (promiscuous compounds) müssen folglich Struktur-Wirkungs-Beziehungen an verschiedenen Rezeptoren (cross-target SARs) untersucht werden, um herauszufinden, wie Veränderungen im Molekül die Affinitäten zu verschiedenen Targets beeinflussen [Hopkins et al., 2006].

A.1 Dopamin und Serotonin

Dopamin und Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT) sind wichtige Neurotransmitter des menschlichen Gehirns. Sie aktivieren postsynaptische und präsynaptische Rezeptoren. Ihre Konzentration im synaptischen Spalt wird durch aktive Wiederaufnahme über Transporter in die präsynaptischen Enden reguliert.

Von den Dopamin- und Serotoninrezeptoren sind Subtypen bekannt, welche sich basierend auf strukturelle und pharmakologische Ähnlichkeiten teilweise in weitere Unterklassen einteilen lassen. Außerdem sind für einige Subtypen polymorphe und Splice-Varianten beschrieben. In Abbildung A-2 und Abbildung A-4 sind alle bisher bekannten Dopamin- und Serotoninrezeptoren dargestellt. Alle diese Rezeptoren sind G-Protein (GTP bindendes Protein) gekoppelte Rezeptoren (GPCRs). Lediglich der 5-HT₃ Rezeptor stellt eine

Ausnahme dar, er ist ein Ligand gesteuerter Ionenkanal, welcher Na^+ und K^+ Ionen Ströme reguliert [Bogeso, Bang-Andersen, 2002].

A.1.1 Dopaminrezeptoren

Die Dopaminrezeptorsubtypen sind nach phylogentischer Verwandtschaft sowie strukturellen und pharmakologischen Gesichtspunkten in zwei Familien eingeteilt. Abbildung A-1 zeigt den Aminrezeptor Ast (amine receptor cluster) und einige Nachbaräste des Stammbaums der humanen GPCRs. Zur D_1 Familie gehören die D_1 und D_5 Rezeptoren, die D_2 Familie umfasst die D_2 , D_3 und D_4 Rezeptoren. Es gibt zwei Isoformen des D_2 Rezeptorproteins, die kurze Splicevariante D_{2S} (short) und die längere Variante D_{2L} (long). Aktivierung von Rezeptoren der D_1 Familie führt über die Stimulation der Adenylatcyclase zum Anstieg der intrazellulären cAMP Konzentration, während nach D_2 , D_3 oder D_4 Rezeptoraktivierung eine Hemmung der Adenylatcyclase und damit eine Senkung des cAMP-Spiegels beobachtet wird (siehe Abbildung A-2 und Abbildung A-3).

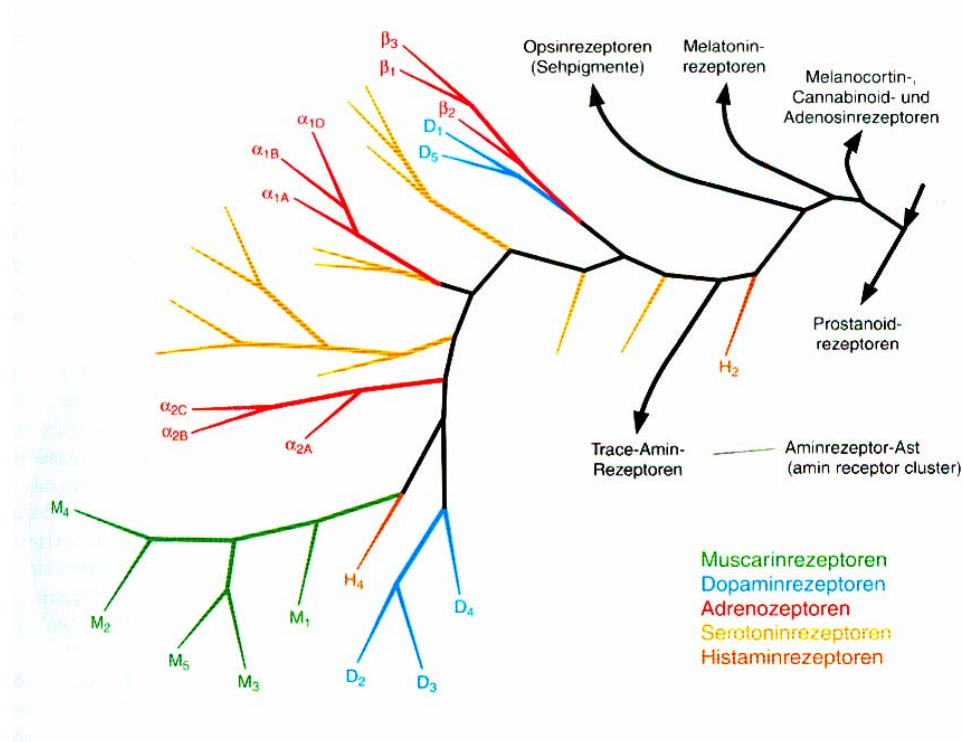


Abbildung A-1 Phylogenetische Verwandtschaft einiger G-Protein gekoppelter Rezeptoren [Aktories et al., 2009]

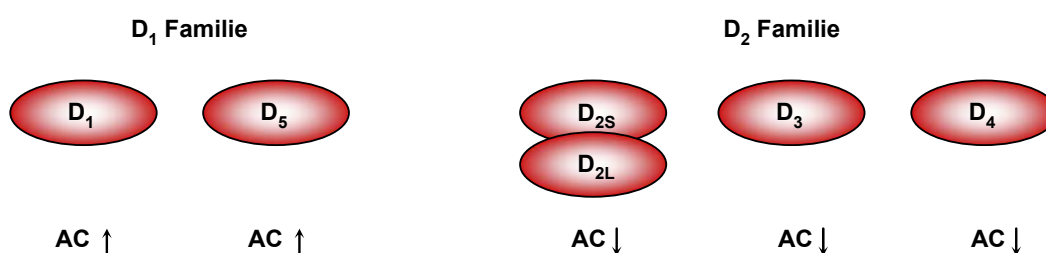


Abbildung A-2 Einteilung der Dopaminrezeptoren [Bogeso, Bang-Andersen, 2002; Tocris Bioscience, 2010]

Dopaminerge Nervenzellkörper finden sich vor allem im Mittel- und Zwischenhirn. Die Neuronengruppen, in denen der Neurotransmitter Dopamin überwiegt, werden auch als Basalganglien bezeichnet. Dopamin D_1 und D_2 Rezeptoren werden in Hirnregionen exprimiert, die mit motorischen, limbischen und neuroendokrinen Funktionen in Verbindung stehen. Die später identifizierten D_3 , D_4 und D_5 Rezeptoren sind weniger verbreitet. D_3 und D_4 Rezeptoren sind vor allem in limbischen Bereichen des Gehirns – welche das emotionale Verhalten steuern – zu finden, während sie im Motorik beeinflussenden Striatum kaum oder gar nicht auftreten. D_5 Rezeptoren sind im menschlichen Gehirn wenig verbreitet. Man vermutet aber, dass sie trotzdem eine Funktion bei Lernprozessen und Gedächtnisleistungen erfüllen [Bogeso, Bang-Andersen, 2002].

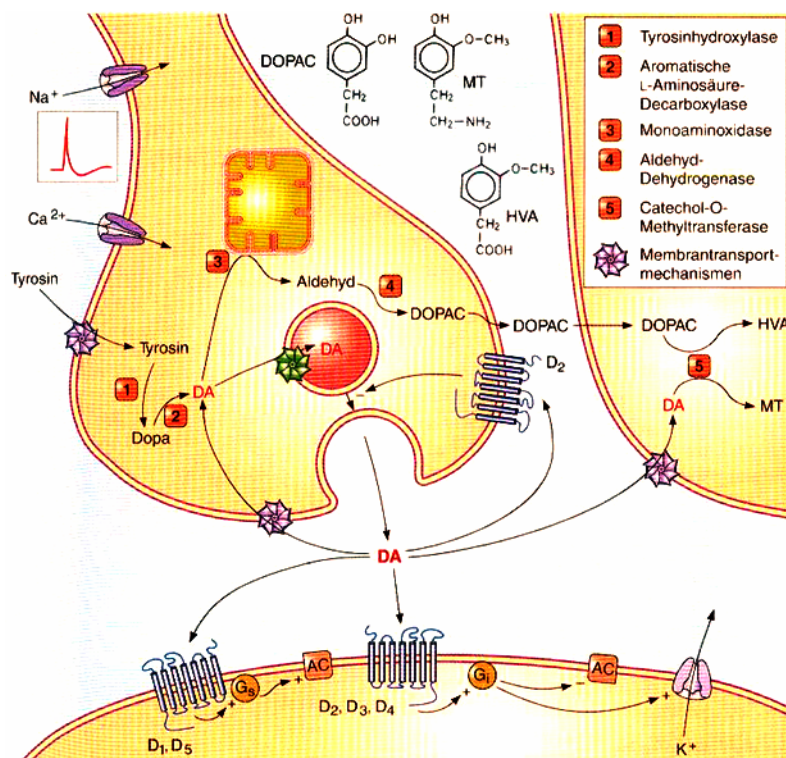


Abbildung A-3 Synaptische Übertragung durch Dopamin, Pfeile bedeuten Stoffbewegungen, Stoffumwandlungen oder Beeinflussungen, + Aktivierung, – Hemmung, aus Tyrosin entsteht Dihydroxyphenylalanin (Dopa) und dann Dopamin (DA), G_i = inhibitorisches G-Protein, AC = Adenylatcyclase, Dopamin kann seine eigene Freisetzung über präsynaptische Autorezeptoren hemmen, Abbau zu Dihydroxyphenylelessigsäure (DOPAC), Methoxythyramin (MT) und Homovanillinsäure (HVA) [Aktories et al., 2009]

Die drei wichtigsten Dopamin gesteuerten Neuronensysteme sollen im Folgenden kurz erläutert werden:

- Nigro-striatales System: Entspringt in der Pars compacta der Substantia nigra, hemmt im Corpus striatum cholinerge Interneurone und reguliert damit die Extrapyrismalmotorik, Degeneration dieser Neurone führt zu Morbus Parkinson
- Mesolimbisches System: Liegt im Mittelhirn nahe der Substantia nigra und projiziert zu Strukturen des Limbischen Systems (z.B. Nucleus accumbens), ist an Motivation und

emotionalen Reaktionen beteiligt, wird auch mesolimbische dopaminerge „Belohnungsbahn“ genannt.

- Tubero-infundibuläres System: Verbindet Hypothalamus und Hypophyse und steuert die Prolaktin Freisetzung, Dopamin hemmt die Sekretion von Prolaktin.

Dopamin selbst und die Agonisten Apomorphin und Bromocriptin besitzen eine höhere Affinität zur D₂ Familie als zur D₁ Familie. Das gilt auch für wichtige Dopaminrezeptor blockierende Wirkstoffe, wie Haloperidol oder Clozapin. Der D₂ Agonist Bromocriptin wird zur Behandlung des Morbus Parkinson eingesetzt, Antagonisten wie Haloperidol werden zur Therapie der Schizophrenie benutzt. Clozapin ist ebenfalls als Neuroleptikum auf dem Markt, hat aber die Besonderheit, dass es vorrangig D₄ Rezeptoren blockiert [Aktories et al., 2009].

A.1.2 Serotoninrezeptoren

Obwohl das ZNS weniger als 2% der Serotoninmenge des gesamten Körpers enthält, spielt Serotonin, biosynthetisiert aus der Aminosäure Tryptophan, eine sehr wichtige Rolle für eine Reihe von Hirnfunktionen. Im Gehirn ist Serotonin hauptsächlich in Nervenbahnen mit Ursprung in den Raphekernen, einer Gruppe von Kernen in Mittelhirn, Pons und Medulla oblongata, lokalisiert. Diese serotonergen Nervenbahnen breiten sich weit in Hirnstamm, Hirnrinde und Rückenmark aus. Außer der Kontrolle von psychischen Stimmungen ist Serotonin auch an vielen anderen Funktionen des Nervensystems beteiligt, wie der Regulation des Schlafes, der Körpertemperatur, des Blutdrucks, der Hormonaktivität sowie der Schmerzwahrnehmung. Außerhalb des Gehirns hat Serotonin ebenfalls Einfluss auf eine Reihe wichtiger Funktionen, vor allem im gastrointestinalen und kardiovaskulären System. Insgesamt sind 14 Serotoninrezeptorsubtypen bekannt, welche sich in 7 Familien gruppieren lassen (Abbildung A-4). Über Rezeptoren der 5-HT₁ und der 5-HT₅ Familie wird die Adenylatcyclase inhibiert, was zu einer Verringerung der intrazellulären cAMP Konzentration führt. Eine Aktivierung von 5-HT₄, 5-HT₆ und 5-HT₇ Rezeptoren lässt über die Aktivierung der Adenylatcyclase die cAMP-Konzentration in der Zelle ansteigen. Werden Rezeptorsubtypen der 5-HT₂ Familie aktiviert, stimuliert dies die Phospholipase C und der Inositolphosphat-Spiegel wird erhöht, woraufhin die intrazelluläre Calcium-Konzentration sinkt (siehe Abbildung A-4 und A-5). Alle Serotoninrezeptorsubtypen werden im menschlichen Gehirn exprimiert. Verschiedene Subtypen sind auch in der Peripherie zu finden. Der 5-HT_{1A} Rezeptor ist an der Regulation von Emotionen und Gefühlen beteiligt. Partielle 5-HT_{1A} Agonisten, wie Buspiron, haben eine anxiolytische und antidepressive Wirkung. Der 5-HT_{2A} Rezeptor ist sowohl im ZNS als auch in der Peripherie zu finden. In der Peripherie ist er weit verbreitet und vermittelt die Kontraktion der bronchialen, gastrointestinalen, vaskulären, urogenitalen und uterinen glatten Muskulatur. Auch Plättchenaggregation und gesteigerte Kapillarpermeabilität sind 5-HT_{2A} vermittelte Funktionen.

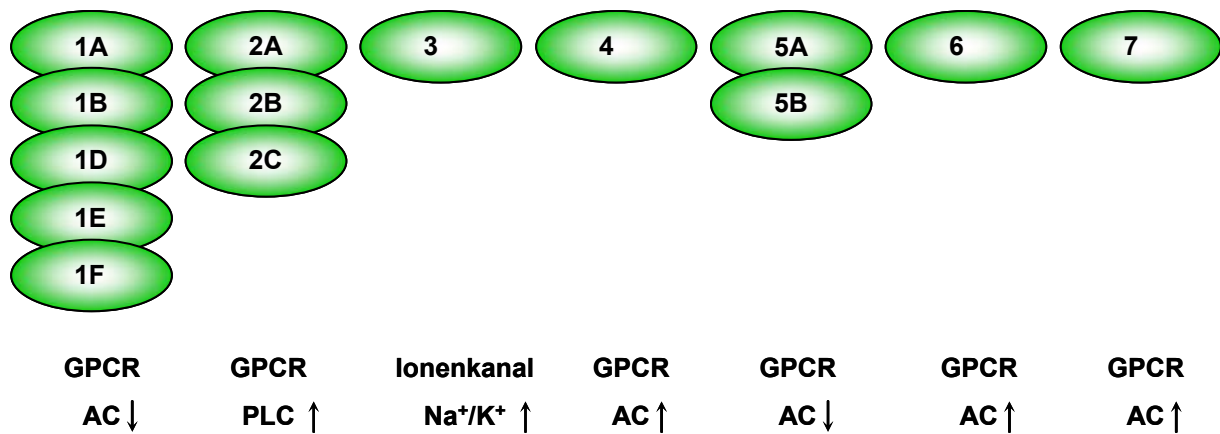


Abbildung A-4 Einteilung der Serotoninrezeptoren [Bogeso, Bang-Andersen, 2002; Tocris Bioscience, 2010]

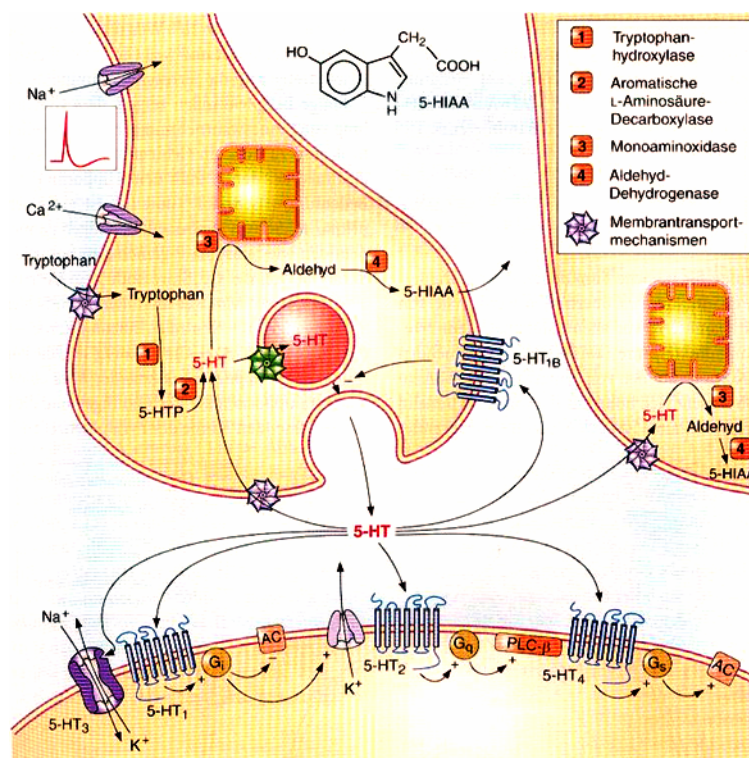


Abbildung A-5 Synaptische Übertragung durch Serotonin, aus Tryptophan entsteht Serotonin (5-HT) über 5-Hydroxytryptophan (5-HTP), Serotonin kann seinen eigene Freisetzung über postsynaptische 5-HT_{1B} Autorezeptoren hemmen, Abbau zu Hydroxyindolessigsäure (5-HIAA) [Aktories et al., 2009]

5-HT_{2A} Antagonisten wie Ketanserin besitzen Potential für den Einsatz als Antihypertonika und Trombozytenaggregationshemmer. Im Gehirn wurde der 5-HT_{2A} Rezeptor in kortikalen Regionen, Teilen des limbischen Systems und in den Basalganglien gefunden. Deshalb sind 5-HT_{2A} Rezeptoren auch wichtige Targets in der Entwicklung von Antipsychotika. Der 5-HT_{2C} Rezeptor (früher 5-HT_{1C}) ist hauptsächlich im Gehirn lokalisiert und ist unter anderem an der Auslösung von Angstgefühlen beteiligt [Heisler et al., 2007]. Antagonismus am 5-HT_{2C} Rezeptor könnte also auch von Bedeutung für die Wirkung antipsychotischer Arzneimittel sein. Außerdem könnte dieser Rezeptorsubtyp für die Gewichtszunahme unter

Antipsychotikabehandlung verantwortlich sein. Der 5-HT₃ Rezeptor ist im kardiovaskulären und gastrointestinalen System weit verbreitet, wurde aber auch im Gehirn gefunden. Übelkeit und gastrointestinale Beschwerden, die oft zu Beginn einer antidepressiven Therapie mit selektiven Serotonin Wiederaufnahmehemmern (SSRIs) auftreten, werden möglicherweise durch Aktivierung von 5-HT₃ Rezeptoren hervorgerufen. 5-HT₃ Antagonisten werden zur Therapie von Übelkeit und Erbrechen, z.B. bei Krebspatienten verwendet. Interessanterweise sind 5-HT₃ Antagonisten in verschiedenen Tiermodellen für Schizophrenien und Angsterkrankungen wirksam. 5-HT₆ und 5-HT₇ Rezeptoren werden hauptsächlich im Gehirn exprimiert. Verschiedene Antidepressiva und Antipsychotika binden mit hoher Affinität an diesen Rezeptoren aber es konnte bisher noch kein klarer Zusammenhang zwischen Rezeptorbindung und klinischem Profil gefunden werden [Bogeso, Bang-Andersen, 2002].

A.1.3 Neuronale Serotonin-Dopamin Interaktion

Zur Serotonin-Dopamin Interaktion gibt es eine große Anzahl, teilweise widersprüchlicher Forschungsarbeiten. Man ist trotz der reichlichen Datenlage weit davon entfernt, den Einfluss von Serotonin auf die Aktivität dopaminerger Neurone vollständig zu verstehen. Die Regulation der dopaminergen Aktivität durch das Serotoninsystem ist vielschichtig und durch die Vielzahl von Serotoninrezeptor Subtypen recht kompliziert. Ein großer Teil der verfügbaren neuroanatomischen Daten weist eindeutig darauf hin, dass die dopaminergen Neuronen des Gehirns hauptsächlich durch serotonerge Einflüsse aus den Raphekernen des Hirnstammes innerviert werden. Umgekehrt innervieren dopaminerge Neurone die Raphekerne und scheinen dort einen anregenden Effekt auszuüben.

Serotonin kann sowohl direkt als auch indirekt über neuronale Regelkreise das Dopamin System beeinflussen. Es kann an membranständigen Rezeptoren der dopaminerger Neurone in der Substantia nigra pars compacta und der Area tegmentalis ventralis (Ventrales Tegmentum, VTA = ventral tegmental area) angreifen und außerdem die Funktion dopaminerger Neurone steuern, indem es die Aktivität GABAerger Interneurone in diesen Hirnregionen beeinflusst. Zusätzlich zu den lokalen Schleifen können große Projektionsbahnen an der indirekten Wirkung von Serotonin auf die Dopamin Aktivität beteiligt sein. Zum Beispiel können präsynaptische oder postsynaptische Serotoninrezeptoren die nigro-striatale oder die mesolimbische Bahn aktivieren und somit die Erregbarkeit der dopaminerger Neurone in der Substantia nigra pars compacta oder Area tegmentalis ventralis verändern, was sich entweder in einer Steigerung oder einer Verringerung ihrer basalen Feuerungsaktivität äußert. Serotonin hat in der Substantia nigra pars compacta einen anderen Einfluss als in der Area tegmentalis ventralis, da diese beiden Populationen dopaminerger Neurone keine homogene Gruppe darstellen. Einige Serotoninrezeptorsubtypen scheinen je nach Lokalisation verschiedene Aufgaben zu erfüllen.

Die Hauptwirkung von Serotonin, welche vor allem über 5-HT_{2C} Rezeptoren vermittelt wird, scheint eine Hemmung dopaminerger Neurone zu sein. Der inhibitorische Einfluss lässt sich z.B. weniger in der Substantia nigra pars compacta, vermehrt aber in der Area tegmentalis ventralis nachweisen. Man nimmt an, dass der inhibitorische Effekt des 5-HT_{2C} Rezeptors indirekt über die Erregung GABAerger ventral tegmentaler Interneurone, die sich wiederum auf dopaminerge Neurone auswirken, vermittelt wird. In der Substantia nigra spielen dagegen 5-HT₄ Rezeptoren eine dominierende Rolle. 5-HT_{2A} und 5-HT₃ Rezeptor Antagonisten sowie 5-HT_{2C} Agonisten reduzieren selektiv die Anzahl spontan aktiver dopaminerger Neurone im ventralen Tegmentum aber nicht in der Substantia nigra. Möglicherweise haben solche Wirkstoffe eine antipsychotische Wirkung mit reduziertem Risiko für extrapyramidale Nebenwirkungen. Interessanterweise wird die Anzahl dopaminerger Neurone in der Substantia nigra pars compacta durch 5-HT₆ Antagonisten gesteigert. Obwohl diese keine antipsychotische Wirkung zeigen, könnten sie nützlich sein, um das Nebenwirkungsprofil von Neuroleptika zu verbessern. Andererseits kann das serotonerge System durch direkte Depolarisationsprozesse oder Beeinflussung der Aktivität bestimmter Hirnareale dopaminerge Neurone im Mittelhirn erregen. Um die Bedeutung dieser zwei gegensätzlichen Effekte zu verstehen, sind noch ausführlichere Untersuchungen zur Funktion der beteiligten Rezeptoren sowie deren Lokalisation unerlässlich [Di Giovanni et al., 2008].

A.1.4 Wirkung atypischer Neuroleptika auf das Serotonin- und Dopamin-system – die „Serotonin-Dopamin“-Hypothese

Neuroleptika lassen sich in typische (klassische) und atypische Wirkstoffe einteilen. Zu den atypischen Neuroleptika werden Verbindungen gezählt, die in therapeutischer Dosis kaum extrapyramidalmotorische Nebenwirkungen (extrapyramidales Syndrom, EPS) zeigen. Wegen ihrer besseren Verträglichkeit und Wirkung auf einige, aber leider nicht alle der heterogenen und komplexen Symptome, haben diese die typischen Neuroleptika aus der Therapie der Schizophrenie und anderer Psychosen anteilig verdrängt.

Prototypen der typischen und atypischen Neuroleptika sind Haloperidol und Clozapin (siehe Abbildung A-6). Die atypischen Neuroleptika sind allerdings keine einheitliche Verbindungs-klasse. Ein Teil der Wirkstoffe hat die Gemeinsamkeit, dass sie – wie auch Clozapin – antagonistisch am 5-HT_{2A} und D₂ Rezeptor wirken, wobei am D₂ Rezeptor eine schwächere Wirkung zu beobachten ist als am 5-HT_{2A} Rezeptor. Zu dieser Gruppe gehören verschiedene Neuroleptika, die entweder schon in der klinischen Praxis angewendet werden oder sich in verschiedenen Stadien der Entwicklung befinden (Asenapin, Iloperidon, Melperon, Olanzapin, Quetiapin, Risperidon, Sertindol, Ziprasidon, Zotepin). Eine Auswahl von Strukturen mit antipsychotischer Wirkung zeigt Abbildung A-6.

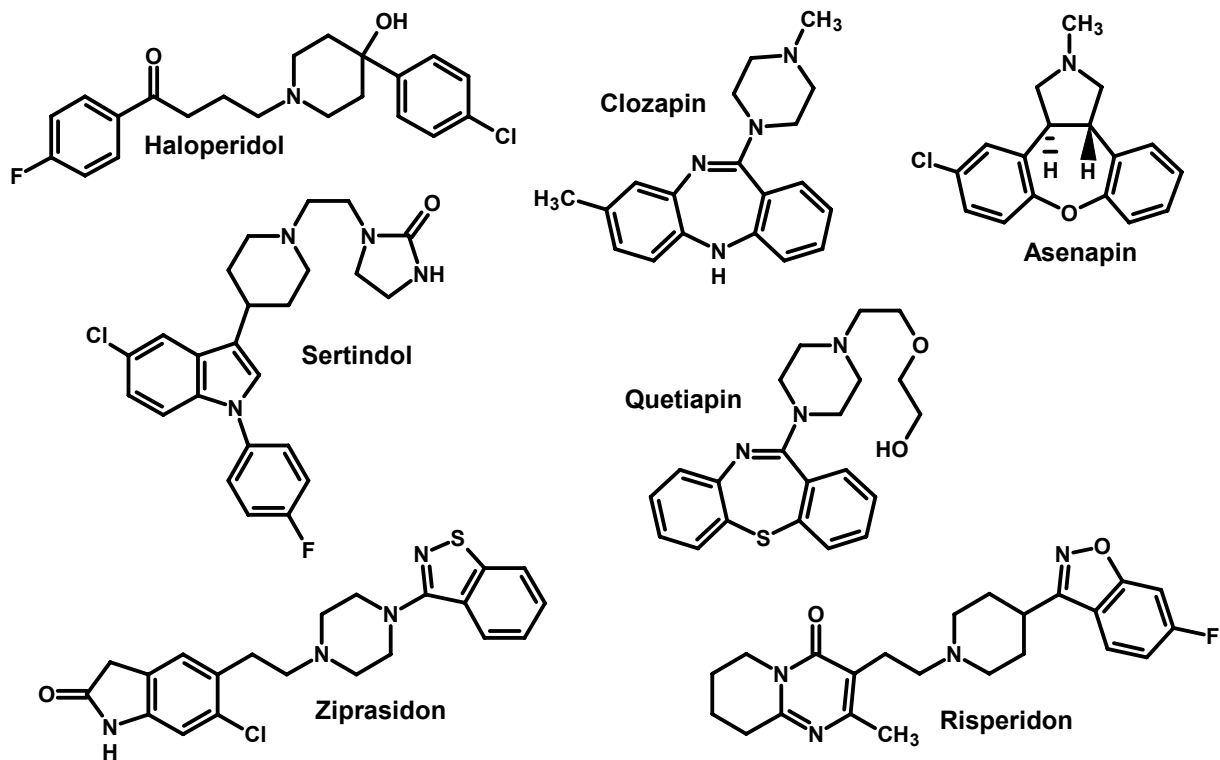


Abbildung A-6 das klassische Neuroleptikum Haloperidol und eine Auswahl atypischer Neuroleptika

Der „Serotonin-Dopamin“-Hypothese steht die alternative „fast-off“-Hypothese von Kapur und Seeman [Kapur, Seeman, 2000] gegenüber, die besagt, dass Substanzen, deren Rezeptor-Ligand-Komplex nach D_2 Rezeptorblockade schnell wieder dissoziiert, ein atypisches Wirkprofil zeigen. Diese „fast-off“-Hypothese lässt sich jedoch nur auf Clozapin und Quetiapin anwenden und passt nicht mit der „slow-off“ Rate (langsame Dissoziation des Rezeptor-Ligand-Komplexes) der meisten atypischen Neuroleptika, wie Olanzapin, Risperidon und Ziprasidon zusammen [Kapur, Seeman, 2001]. Im Gegensatz zur „fast-off“-Hypothese von Kapur und Seeman, ist die „ $5-HT_{2A}/D_2$ “-Hypothese [Meltzer, 1989] bisher nicht widerlegt. Im Jahr 2008 diskutierten Meltzer et al. die „Serotonin-Dopamin“-Hypothese in einem Übersichtsartikel [Meltzer, Huang, 2008].

In Tierexperimenten wurde festgestellt, dass die Clozapin ähnlichen atypischen Neuroleptika die Fähigkeit besitzen, die Dopamin Ausschüttung in Kortex und Hippocampus zu verstärken, während der Effekt im limbischen System wesentlich geringer ist. Klassische Neuroleptika haben einen gegensätzlichen Effekt. Alle atypische Neuroleptika sind unter anderem Antagonisten am $5-HT_{2A}$ Rezeptor. Eine Kombination eines $5-HT_{2A}$ Inversagonisten mit subtherapeutischen Dosen eines atypischen oder typischen Neuroleptikums zeigt ähnliche Effekte wie ein atypisches Neuroleptikum in therapeutischer Dosis allein [Meltzer, Huang, 2008]. Es gibt nur wenige klinische Studien mit selektiven $5-HT_{2A}$ Inversagonisten aber die vorliegenden Ergebnisse unterstützen die Ansicht, dass dopaminvermittelte Psychosen bei Schizophrenie oder Parkinson Erkrankungen auf $5-HT_{2A}$ Rezeptorblockade ansprechen [Meltzer, Huang, 2008].

Es gibt reichlich Hinweise darauf, dass verschiedene 5-HT Rezeptoren für die Wirkung der atypischen Neuroleptika von großer Bedeutung sind. Mindestens drei verschiedene Serotoninrezeptorsubtypen scheinen an der Regulation des Dopamin Effluxes in Kortex, Hippocampus, Nucleus accumbens und höchstwahrscheinlich auch im ventralen Tegmentum und der Substantia nigra pars compacta beteiligt zu sein. Besondere Bedeutung scheint der Wirkung an 5-HT_{2A} Rezeptoren und auch an den Subtypen 5-HT_{1A} und 5-HT_{2C} zuzukommen [Rollema et al., 1997; Millan et al., 1998; Dunlop et al., 2006; Marquis et al., 2007; Meltzer, Huang, 2008; Grauer et al., 2009]. 5-HT_{2A} Antagonisten müssen zusätzlich ein gewisses Maß an D₂ Blockade aufweisen, um bei schizophrenen Patienten mit akuter Psychose wirksam zu sein [Kuroki et al., 2008; Meltzer, Huang, 2008]. Zur Vorbeugung von wiederkehrenden Psychosen scheint aber 5-HT_{2A} Antagonismus allein, durch selektive Antagonisten wie Pimavanserin oder M100907 wirksamer zu sein. Diesen Aspekt könnte man sich zur Nachbehandlung der Patienten zunutze machen [Meltzer, Huang, 2008].

5-HT_{2C} Agonismus und Antagonismus, sowie 5-HT₆ Antagonismus werden ebenfalls als wichtige Angriffspunkte einiger Antipsychotika und kognitionsverbessernder Wirkstoffe diskutiert [Frederick, Meador-Woodruff, 1999; Woolley et al., 2003; Lieben et al., 2005; Dunlop et al., 2006; Marquis et al., 2007; Meltzer, Huang, 2008].

Demnach sollte sowohl das dopaminerge als auch das serotonerge System als Target für die Entwicklung von wirkungsvollen Neuroleptika beachtet werden. Das führt zur Suche nach neuen Wirkstoffen mit komplexer Pharmakologie und beendet die ausschließliche Suche nach „single-receptor targets“ und Wirkstoffen, die selektiv an einem Rezeptor angreifen. [Meltzer et al., 2003]

A.2 Entwicklung neuer Liganden als pharmakologische Werkzeuge oder potentielle Arzneistoffe

Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem Bindungsverhalten verschiedener Substanzklassen, welche nachfolgend kurz beschrieben werden sollen.

A.2.1 Diarylazecine und deren ringerweiterte Homologe

Die meisten der im Arbeitskreis entwickelten aromatisch anellierten Azecinderivate und deren Homologe (nachfolgend allgemein als Azecine bezeichnet) sind potente Dopaminrezeptorantagonisten, die bevorzugt an Rezeptoren der D₁ Familie binden [Hoefgen et al., 2006; Enzensperger et al., 2007b]. In früheren Untersuchungen einiger Azecine stellte man bei diesen auch antagonistische Aktivität an 5-HT_{2A} Rezeptoren fest [Rostom et al., 2001; El Subbagh et al., 2002; Hamacher et al., 2006; Enzensperger et al., 2008], was zusätzlich zum Dopaminantagonismus ein wichtiger Aspekt bezüglich einer antipsychoti-

schen Wirkung ist. Die Substanzen sind ausnahmslos noch in der präklinischen Entwicklung, aktuell werden in vivo Testungen durchgeführt.

Die Leitstruktur der Azecine und Azecinhomologen ist das von Witt synthetisierte Benzindoloazecin LE300 (Abbildung A-7) [Witt et al., 2000]. Dieses Molekül vereint die Arylethylamin-Grundstrukturen des Dopamins und Serotonins in einem 10-gliedrigen Ringgerüst.

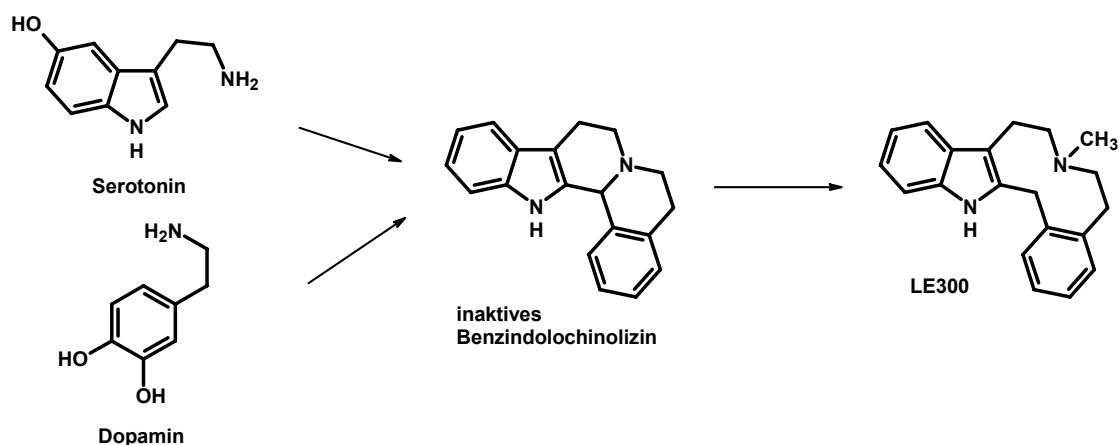


Abbildung A-7 Dopamin und Serotonin als Struktureinheiten des LE300 [Enzensperger, 2007]

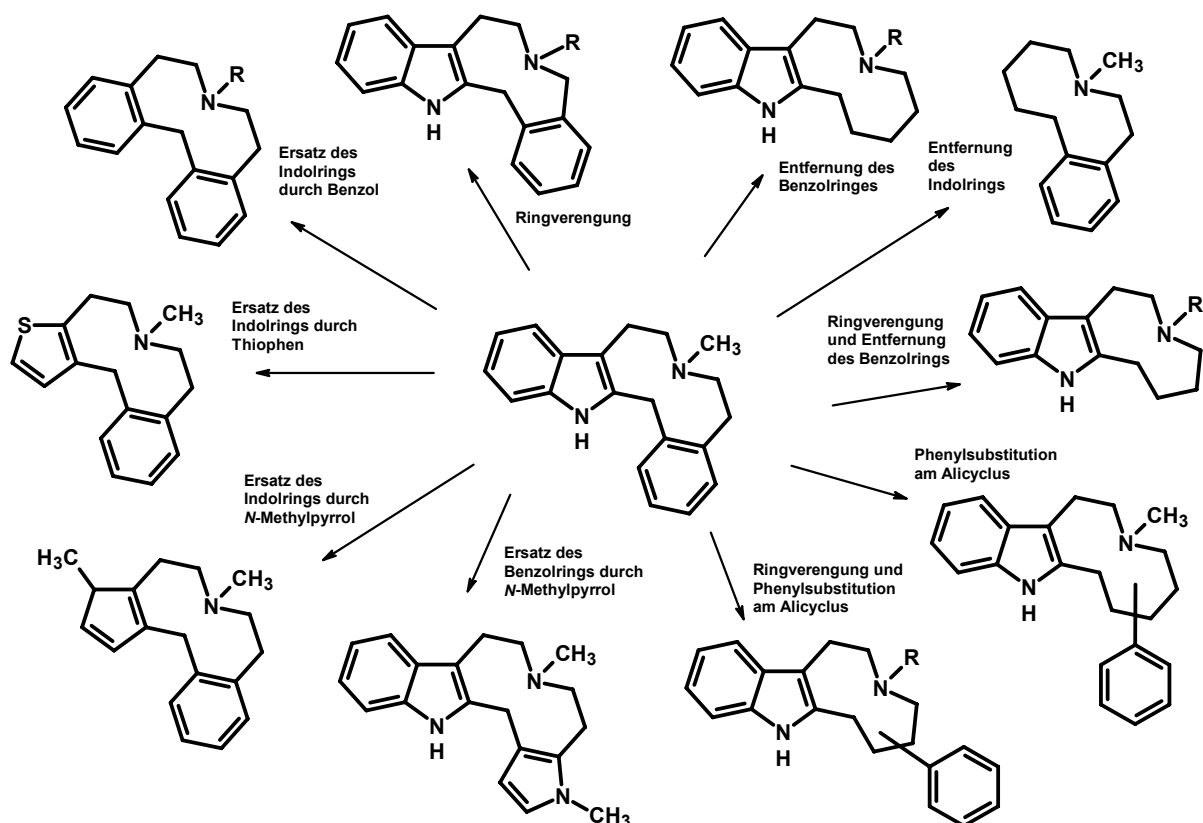


Abbildung A-8 einige vom LE300 ausgehende Strukturvariationen [Hoefgen et al., 2006; Enzensperger, 2007]

Das LE300 wurde an verschiedenen Rezeptoren untersucht und zeigte gute bis sehr gute Affinitäten an den Dopaminrezeptorsubtypen

Um Struktur-Wirkungs-Beziehungen aufstellen zu können, wurden zahlreiche Strukturvariationen der Azecine realisiert und die pharmakologischen Profile untersucht. Einige Variationen, die ausgehend vom LE300 synthetisiert wurden, sind in Abbildung A-8 zu sehen.

Außer den in Abbildung A-8 dargestellten Verbindungen wurden auch *N*-Methyldibenzazecine und -benzindoloazecine mit Hydroxy-, Methoxy-, Chloro- und Aminosubstituenten an verschiedenen Positionen der aromatischen Ringe, sowie Homologe, deren zentraler Ring durch die Einführung von Sauerstoffatomen oder Methylengruppen erweitert wurde, und Derivate, die am basischen Stickstoff andere Reste als die Methylgruppe tragen, untersucht.

Der Austausch des Indols durch andere Aromaten führte ebenfalls zu affinen Verbindungen während beim Verzicht auf einen der Aromaten Wirkverlust zu beobachten war [El Subbagh et al., 2002; Hoefgen et al., 2006]. Besonders erfolgreich war der Ersatz des Indols durch substituiertes Benzen, was zur Klasse der Dibenz[*d,g*]azecine (im Folgenden als Dibenzazecine bezeichnet) führte. Die Dibenzazecine wurden zur Behandlung der Schizophrenie patentiert [Lehmann et al., 2006].

In verschiedenen Arbeiten, die sich mit Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Azecine beschäftigten, konnten folgende Regeln für die Affinität zu Dopaminrezeptorsubtypen aufgestellt werden:

- Zwei kondensierte Aromatensysteme müssen durch eine Methylengruppe getrennt sein [Hoefgen, 2002; Hoefgen et al., 2006].
- Methylsubstitution am basischen Stickstoff zeigt die höchste Affinität, kein Substituent oder größere Alkyl- und Arylalkylsubstituenten verringern die Affinität [Decker, 2001; Decker, Lehmann, 2003; Mohr, 2005].
- Ringverengung des zentralen Azecinrings zum 9-Ring führt zum Affinitätsverlust [Hoefgen, 2002; Hoefgen et al., 2006].
- Vergrößerung des zentralen Ringes der Dibenzazecine zum 11-Ring, wird toleriert und verändert die Bindungseigenschaften nicht [Enzensperger, 2007; Enzensperger et al., 2007b].
- Vergrößerung des zentralen Rings der Dibenzverbindungen zum 12-Ring verringert die Affinität drastisch [Enzensperger, 2007; Enzensperger et al., 2007b].
- Hydroxylierte Dibenzazecine zeigen eine höhere Affinität zur D₁ Familie als methoxylierte, an D₂ Rezeptoren ist der Einfluss gering [Mohr, 2005; Hoefgen et al., 2006].

- In 3-Stellung substituierte Dibenzazecine haben eine höhere Affinität als 1- und 2-substituierte, besonders 3-Hydroxylierung steigert die Affinität [Mohr, 2005; Hoefgen et al., 2006].
- 4-Chloro-3-hydroxy-dibenz[d,g]azecin zeigt herausragende picomolare Affinitäten zur D₁ Familie [Mohr, 2005; Mohr et al., 2006].
- Die Affinitäten 2-hydroxylierter Dibenzazecine werden durch Chlorierung in 1-Position mehr gesteigert, als durch Chlorierung in 3-Position [Mohr, 2005; Mohr et al., 2006].
- Bei 3-hydroxylierten Dibenzderivaten wird durch weitere Substituenten in 2-Stellung die Affinität gesenkt [Mohr, 2005; Mohr et al., 2006].
- Isoosterer Austausch der Methylengruppe in Position 5 des zentralen 11-Rings der Dibenz[d,g]-2-azacycloundecane gegen ein Sauerstoffatom erhöht die Selektivität zur D₁ Familie, Hydroxysubstitution in 3-Position verstärkt diesen Effekt [Wittig, 2004; Wittig et al., 2004].
- Monomethoxylierte Dibenzazecine und Homologe haben stärkere Affinitäten als die dimethoxylierten Derivate, dabei ist die Substitution in 2-Stellung gegenüber der 3-Substitution von Vorteil [Hoefgen et al., 2006; Enzensperger, 2007].
- Bei ringerweiterten Homologen des LE300 hat die Position der Ringerweiterung einen Einfluss auf die Affinität – die Verbindung mit Indolylpropylaminstruktur ist an allen Dopaminrezeptoren weniger affin als LE300, Verbindungen mit Phenylpropylaminstruktur zeigen sogar bessere Affinitäten als das Benzindoloazecin [Enzensperger, Lehmann, 2006; Enzensperger, 2007].
- Indol-N-Methylierung eines Benzindoloazecins und 2-fache Chlorierung eines Dibenzazacycloundecans führt zum Verlust der D₁, D₅ Selektivität [Decker, Lehmann, 2003; Enzensperger, 2007; Enzensperger et al., 2007a].
- Dichlorierte Derivate zeigen eine gesteigerte Affinität zu D₄ Rezeptoren (Clozapin ähnliches Wirkprofil) [Mohr, 2005; Mohr et al., 2006].
- Die Chinolizine als rigide synthetische Vorstufe der relativ flexiblen Azecine besitzen keine oder nur schwache Affinität zu den Dopaminrezeptorsubtypen [Enzensperger, 2007].
- „Verschieben“ des cycloaliphatischen Stickstoffs führt zu drastischem Wirkungsverlust [Enzensperger, 2007; Schulze et al., 2009].

Es gilt mittlerweile als bestätigt, dass Antagonisten mit GPCRs vom Amincluster (z.B. Dopamin-, Serotonin-, Noradrenalin- oder Histaminrezeptoren) hauptsächlich mit zwei hydrophoben Bereichen und einem anionischen Aspartatrest in der Bindungstasche des Rezeptors wechselwirken [Surgand et al., 2006]. Die meisten Antagonisten besitzen daher zwei Aromaten, die mit den hydrophoben Bereichen interagieren können und einen basischen Stickstoff, der eine Ionenbindung mit dem anionischen Aspartat eingehen kann.

Bisher ist nicht vollständig aufgeklärt, in welcher Anordnung sich diese drei Pharmakophore befinden müssen, um maximale Affinität zum Rezeptor zu erreichen. Die Variation der Abstände und Bindungswinkel kann weitere Hinweise zur Aufklärung der Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen liefern.

A.2.2 Arylpiperazinderivate

Arylpiperazin ist das Kernstück vieler bioaktiver Verbindungen mit unterschiedlichen pharmakologischen Wirkungen. Man stellte fest, dass sie an verschiedenen Dopamin [Bettinetti et al., 2002; Hackling et al., 2003; Jurczyk et al., 2004] und Serotoninrezeptorsubtypen [Jurczyk et al., 2004] sowie an α_1 -Adrenozeptoren [Elworthy et al., 1997; Jurczyk et al., 2004] wirken. Verschiedene Arbeiten zeigten, dass Moleküle in denen ein Arylpiperazin über eine Butylamidkette mit einem aromatischen System verbunden ist, selektive D₃ Liganden sind, deren Funktionalität hauptsächlich vom verwendeten Phenylsubstituenten abhängt, zum Beispiel BP897, FAUC365, NGB2904 und GR103691 (Abbildung A-9) [Murray et al., 1995; Yuan et al., 1998; Pilla et al., 1999; Bettinetti et al., 2002].

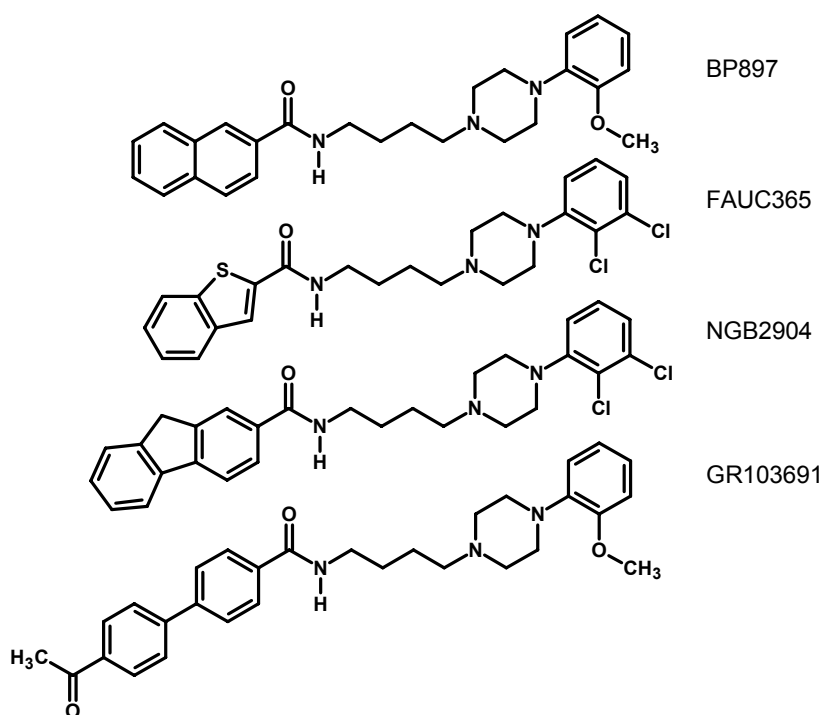


Abbildung A-9 D₃ selektive Liganden mit dem Strukturschema: Aromatisches System – Butylamidspacer – Arylpiperazin [Murray et al., 1995; Yuan et al., 1998; Pilla et al., 1999; Bettinetti et al., 2002]

Strukturell ähnliche Verbindungen die über einen Alkylspacer cyclische Benzamide mit Arylpiperazinen verbinden, wurden als D₂/5-HT_{2A} Antagonisten und atypische antipsychotische Wirkstoffe identifiziert [Norman et al., 1994; Norman et al., 1996a; Norman et al., 1996b]. Dabei erwies sich eine viergliedrige Kohlenstoffkette als optimale Verbindung der beiden Strukturmerkmale. Norman et al. fassten zusammen, dass die Verbindungen durch

den Butylspacer eine gefaltete Konformation einnehmen können, die durch eine intramolekulare Wasserstoffbrücke zwischen dem protonierten Piperazin und der Amidstruktur stabilisiert wird. Die flexible Butylkette erlaubt einen optimalen Abstand zwischen den terminalen Pharmakophoren und eine hervorragende Anpassung an die Bindungstasche, was zu einer optimalen D₂ Rezeptorbindung führt [Norman et al., 1996a]. Die dopaminergen Bindungseigenschaften sind jedoch nicht auf D₂ und D₃ Rezeptoren beschränkt. Arylpiperazine, die über eine Methylenbrücke mit verschiedenen Heteroaroma-ten verbunden sind, binden bevorzugt am D₄ Rezeptor [Lober et al., 1999; Abadi, 2004].

A.2.3 Apomorphinderivate

Die natürlich vorkommenden Aporphinalkaloide und ihre synthetischen Derivate dienen seit Jahrzehnten als Leitstruktur für die Entwicklung neuer Wirkstoffe [Phillipson et al., 1985; Zhang et al., 2007a; Zhang et al., 2007b]. *R*-(-)-Apomorphin, der halb- oder vollsynthetische Prototyp der Aporphinalkaloide ist ein gut untersuchter Dopaminrezeptoragonist (siehe Abbildung A-10). Seit den 1990er Jahren ist es in Europa als Parkinson Therapeutikum auf dem Markt [Neumeyer et al., 2003; Kolls, Stacy, 2006]. Außerdem ist Apomorphin seit 2001 zur Behandlung der erektilen Dysfunktion zugelassen [Schultheiss, Stief, 2003].

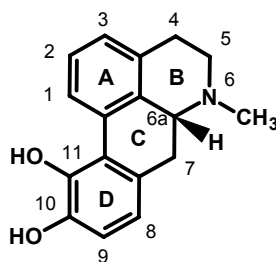


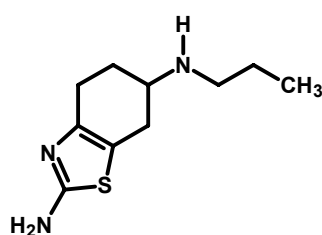
Abbildung A-10 (*R*)-Apomorphin

Trotz seiner hohen intrinsischen Aktivität und der schnellen symptomverbessernden Wirkung hat es verschiedene Nachteile, wie schlechte Bioverfügbarkeit, kurze Wirkdauer und zentrale, Emesis erregende Nebenwirkungen [Neumeyer et al., 2003; Kolls, Stacy, 2006; Subramony, 2006]. Ein wichtiges Strukturelement des Apomorphins ist die Catecholstruktur, sie trägt zur hohen dopaminergen Aktivität bei, indem sie Wasserstoffbrücken zum Rezeptor ausbildet. Andererseits ist die Catecholfunktion chemisch instabil. Die leichte Oxidierbarkeit und auch die hohe Wasserlöslichkeit sind Ursachen für schlechte Bioverfügbarkeit und kurze Wirkdauer des Apomorphins.

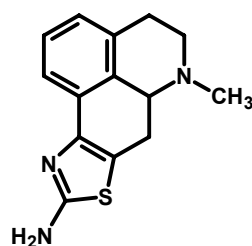
Verschiedene Arbeitskreise beschäftigen sich mit der Entwicklung und Verbesserung potenter und selektiver D₂ Agonisten vom Aporphintyp [Toth et al., 2007; Zhang et al., 2007a; Zhang et al., 2007b; Sipos, Berenyi, 2008; Sipos et al., 2008a; Sipos et al., 2009a]. Der bioisostere Ersatz der Catecholfunktion sollte das pharmakologische Profil verbessern. Liu et al. ersetzten die Catecholstruktur durch 2-Aminothiazol und beschrieben kürzlich die

Synthese und Pharmakologie einer Serie von 2-Aminothiazol-Apomorphinen darunter auch die im Rahmen dieser Arbeit getestete Verbindung AM3 (siehe Abbildung B-11) [Liu et al., 2008]. Dabei stellte man fest, dass die Catecholstruktur essentiell für die Dopamin Rezeptorbindung ist, da nur das 2-Aminothiazolderivat mit intakter Catecholfunktion Affinitäten zum D₁ und D₂ Rezeptor aufwies. Damit zeige sich auch, dass relativ große Substituenten wie 2-Aminothiazol in C2 und C3 Position toleriert werden. Dies ist ein wichtiger Zusatz zu den früheren Beobachtungen, dass nur kleine Substituenten an C2 wie, Methoxy, Hydroxy, Amino, und Fluor die Dopaminrezeptorbindung begünstigen [Gao et al., 1990; Neumeyer et al., 1990; Zhang et al., 2007a; Zhang et al., 2007b; Liu et al., 2008].

Vor kurzem wurden die Fortschritte verschiedener Arbeitsgruppen, welche die Struktur-Wirkungs-Beziehungen von Apomorphinderivaten an den Dopaminrezeptorsubtypen untersuchen, in einem Übersichtsartikel zusammengefasst [Zhang et al., 2007b]. Es zeigte sich, dass die absolute Konfiguration am Kohlenstoffatom C6a (siehe Abbildung A-10) für die Eigenschaften am Dopaminrezeptor große Bedeutung besitzt. *R*-(-)-Enantiomere sind als Dopaminrezeptoragonisten bekannt, während die *S*-(+)-Verbindungen Antagonistenwirkung zeigen. Außerdem wurde berichtet, dass die C2 und C3 Substituenten am A-Ring des Apomorphins große Bedeutung für ihr Bindungsvermögen an den Dopaminrezeptoren besitzen. Diese Hypothese basiert auf Ergebnissen, die für die Existenz einer lipophilen Vertiefung im Rezeptorprotein sprechen [Sondergaard et al., 2005]. Sondergaard et al. publizierten, dass Verbindungen mit großen Substituenten in 2-Stellung, wie 4-Hydroxyphenyl, eine hohe Affinität zu D₂ Rezeptoren besitzen.



Pramipexol



Aminothiazol Bioisoster
des Apomorphins

Abbildung A-11 Verbindungen mit 2-Aminothiazolfunktion als heterocyclisches Bioisoster des Phenolrestes

Thiazol-Ringsysteme sind oft genutzte Strukturelemente der medizinischen Chemie mit sehr guten pharmakologischen Eigenschaften. Mit 2-Aminosubstitution wird dieses Strukturelement zum Beispiel in der Entwicklung von Stoffen zur Behandlung von Allergien, Bluthochdruck, Entzündungen, Schizophrenie und HIV-Infektionen genutzt [Hargrave et al., 1983; Haviv et al., 1988; Clemence et al., 1988; Jaen et al., 1990; Patt et al., 1992; Bell et al., 1995]. 2-Aminosubstituierte Thiazole als Teilstruktur sind auch bekannt als Strukturmerkmale von Liganden an Östrogenrezeptoren [Fink et al., 1999] und einer neuen Klasse von Adenosinrezeptoren [Muijlwijk-Koezen et al., 2001; Chordia et al., 2002]. Am

Beispiel des Dopaminagonisten Pramipexol [Schneider, Mierau, 1987; Mierau et al., 1995] und einem Aminothiazol-haltigen Aporphinderivat [Schneider, Mierau, 1987] konnte gezeigt werden, dass die 2-Aminothiazolfunktion ein heterocyclisches Bioisoster phenolischer Reste ist (Abbildung A-11).

Seitdem wird dieses Strukturelement oft statt des Phenolrestes eingesetzt [van Vliet et al., 2000; Zhang et al., 2003; Zhang et al., 2004]. Aufbauend auf diese Erkenntnisse wurden vom Arbeitskreis Sipos verschiedene Thiazolo- und Isothiazoloapomorphine synthetisiert und ihr pharmakologisches Profil im Rahmen dieser Arbeit im Arbeitskreis Lehmann untersucht.

A.3 Zielstellung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollten potentielle Liganden aus verschiedenen Verbindungsklassen auf Affinität und Funktionalität (intrinsische Aktivität) an Dopaminrezeptorsubtypen sowie – erstmals im Arbeitskreis – auch an dem Serotoninrezeptorsubtyp 5-HT_{2A} untersucht und Struktur-Wirkungs-Beziehungen diskutiert werden.

A.3.1 Assay Entwicklung

Die Zielstellung der Arbeit erforderte eine Weiterentwicklung bzw. Erweiterung der bestehenden Assay Möglichkeiten.

A.3.1.1 Etablierung eines fluoreszenzbasierten funktionellen Calcium Assays mit HEK D₃ Zellen

Bisher standen dem Arbeitskreis nur Dopamin D₃ Rezeptoren zur Verfügung, die von CHO Zellen exprimiert wurden. Versuche, das im Arbeitskreis für D₁, D₂ und D₅ Experimente etablierte funktionelle Calcium Assay mit CHO D₃ Zellen durchzuführen, scheiterten, da sich die CHO Zellen nicht mit dem verwendeten anionischen Fluoreszenzfarbstoff anfärben ließen. Fluoreszenzmikroskopisch ließ sich beobachten, dass die CHO Zellen den Farbstoff zwar in das Zellinnere aufnahmen, aber innerhalb kurzer Zeit wieder nach außen transportierten, während bei den HEK Zelllinien der Farbstoff in die Zelle transportiert wurde und dort auch nach mehreren Stunden noch unverändert zu sehen war. Da nun D₃ Rezeptor exprimierende HEK Zellen zur Verfügung standen, sollte das funktionelle Calcium Assay auch am Dopamin D₃ Rezeptor etabliert werden.

A.3.1.2 Charakterisierung von HEK D₂ und D₃ Zelllinien für Radioligandbindungsexperimente zum Ersatz von CHO D₂ und D₃ Zelllinien

Die im Arbeitskreis etablierten Radioligandbindungsstudien an Dopamin D₂ und D₃ Rezeptoren wurden bisher mit CHO Zelllinien, die die entsprechenden Rezeptorsubtypen exprimieren, durchgeführt. Gleichzeitig wurden HEK D₂ Zellen kultiviert, um damit das funktionelle Calcium Assay durchzuführen. Zudem sollten jetzt auch HEK D₃ Zellen für das geplante Calcium Assay am Dopamin D₃ Rezeptor kultiviert werden. Da sich Radioligandbindungsexperimente sowohl mit CHO, als auch mit HEK Zelllinien durchführen lassen, erschien es sinnvoll, die Radioligandmessungen an Dopamin D₂ und D₃ Rezeptoren von CHO Zelllinien auf HEK Zelllinien umzustellen, um nicht unnötig viele unterschiedliche Zelllinien kultivieren zu müssen.

A.3.1.3 Charakterisierung HEK 5-HT_{2A} Zellen und Etablierung von Radioligand-bindungsexperimenten am 5-HT_{2A} Rezeptor

Da das Dopaminsystem in enger Verbindung mit dem Serotoninsystem steht und hier unter anderem der Serotoninrezeptorsubtyp 5-HT_{2A} von großer Bedeutung ist, sollten zusätzlich zu den fünf Dopaminrezeptorsubtypen auch Affinitäten am 5-HT_{2A} Rezeptor untersucht werden. Dazu sollte die entsprechende Zelllinie, die dem Arbeitskreis noch nicht zur Verfügung stand, etabliert und deren B_{max}- und K_d-Werte charakterisiert werden, um anschließend Radioligandbindungsstudien durchführen zu können.

A.3.1.4 Versuch der Etablierung eines funktionellen Calcium Assays mit 5-HT_{2A} Zellen

Um nicht nur Affinitäten am Serotonin 5-HT_{2A} Rezeptor zu bestimmen, sondern auch Aussagen über die Funktionalität der Verbindungen am Rezeptor treffen zu können, sollte versucht werden, das im Arbeitskreis bereits für einige Dopaminrezeptorsubtypen etablierte Calcium Assay auf die 5-HT_{2A} Rezeptor exprimierende Zelllinie zu übertragen.

A.3.2 Untersuchung von Azecinen und Homoazecinen und Synthese von Oxazacycloundecanen

Die Affinitätsdaten von im Arbeitskreis synthetisierten Azecinen für die Dopamin D₁ bis D₅ Rezeptoren sollten vervollständigt und zusätzlich die Affinitäten zum 5-HT_{2A} Rezeptor gemessen werden. Außerdem sollte auch die Affinität verschiedener synthetischer Vorstufen der Azecine mit 5-HT_{2A} Rezeptoren und Dopaminrezeptoren ermittelt werden. Neue Homoazecine mit sauerstoffhaltigem zentralen 11-Ring sollten synthetisiert und pharmakologisch charakterisiert werden.

A.3.3 Untersuchung von Arylpiperazinderivaten

Von A. Abadi (Kairo, Ägypten) wurden Verbindungen mit einer Arylpiperazinbutyllactam-Grundstruktur zu Verfügung gestellt. Die Struktur und Reinheit dieser Syntheseprodukte sollte per GC/MS und HRMS bestätigt werden und anschließend das pharmakologische Profil der Verbindungen mit den zur Verfügung stehenden Assays untersucht werden. Damit sollte die Frage geklärt werden, wie sich das Bindungsprofil solcher Strukturen verändert, wenn die Amidfunktion in einen Heterocyclus eingebunden ist, statt wie bei den Eingangs erwähnten D₃ selektiven Liganden ähnlicher Struktur (siehe Abbildung A-9) exocyclisch in der Butylamidkette vorzuliegen. Außerdem sollte hier der Einfluss verschieden substituierter Arylpiperazine und verschiedener Heterocyclen untersucht werden.

Ein weiterer Verbindungssatz der bewährten Grundstruktur Aryl/Heteroaryl + Spacer + basischer Rest (Arylpiperazin) wurde von D. El Ella (Kairo, Ägypten) zur pharmakologischen Charakterisierung bereitgestellt. Es sollten hier die Bindungsprofile von Verbindungen mit

flexiblem Thiopropylspacer gegenüber Verbindungen mit semirigider Acetamidbrücke untersucht werden. Zudem sollten verschiedene Heteroaromaten und unterschiedliche Substitutionsmuster der Aromaten diskutiert werden.

A.3.4 Bindungsstudien mit Apomorphinderivaten

A. Sipos (Debreczin, Ungarn) stellte verschiedene Substanzen mit Apomorphingrundgerüst zur Verfügung, die ebenfalls an Dopaminrezeptoren und dem 5-HT_{2A} Rezeptor vermessen werden sollten. Es handelt sich hierbei um am A-Ring des Apomorphins (siehe Abbildung A-10) modifizierte Verbindungen. Folgende Fragestellungen sollten geklärt werden:

- Welchen Einfluss haben am A-Ring des Apomorphins anellierte Thiazol- und Isothiazol-Ringsysteme auf das Bindungsprofil?
- Welche Bindungseigenschaften haben Derivate, an deren A-Ring in verschiedenen Positionen ein Thiochroman-Ringsystem kondensiert ist?
- Wie verhalten sich Apomorphinderivate, die in 2-Stellung eine zusätzliche Hydroxygruppe tragen, wenn in Position 1 verschiedene Benzylsubstituenten eingeführt werden?

B ALLGEMEINER TEIL

Die Struktur und Reinheit der Zielverbindungen wurde durch NMR- und IR-Spektroskopie, Schmelzpunkt und Elementaranalyse oder hochauflösende Massenspektrometrie abgesichert.

B.1 Azecine und Homoazecine

Um weitere Kenntnisse zu Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Azecine und Azecinhomologen zu gewinnen, sollten neue Derivate dargestellt und pharmakologisch charakterisiert werden. Enzensperger untersuchte bereits Homologe des von Witt synthetisierten Benz[*d*]indolo[2,3-*g*]azecins LE300 [Witt, 1994; Witt et al., 2000], deren zentraler Ring um eine Methylengruppe zum 11-Ring erweitert wurde. Von den beiden möglichen Isomeren erwies sich die Verbindung CE560 mit Tryptaminteilstruktur (wie im LE300) gegenüber der Homotryptamin Verbindung CE580 (Abbildung B-1) bezüglich der Rezeptoraffinitäten als überlegen [Enzensperger, Lehmann, 2006]. Zusätzlich zur Ringerweiterung sollte nun untersucht werden, wie sich eine veränderte Elektronenverteilung im Molekül auf die Bindungseigenschaften der Benzindoloazecine auswirkt. Dazu sollte eine Methylengruppe des zentralen 11-Rings der Verbindung CE560 durch Sauerstoff ersetzt werden (Abbildung B-1).

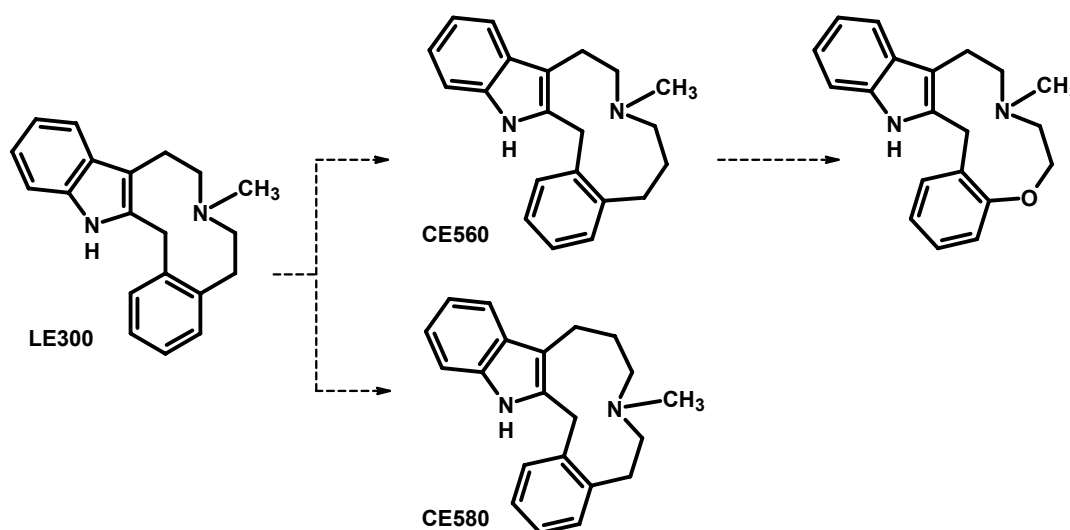


Abbildung B-1 Leitstruktur der Benz[*d*]indolo[2,3-*g*]azecine und ringerweiterte Homologe

Dibenzverbindungen mit sauerstoffhaltigem zentralen 11-Ring wurden schon von Wittig synthetisiert [Wittig et al., 2003; Wittig, 2004]. Enzensperger untersuchte die entsprechenden 11-gliedrigen Kohlenstoffanaloga und deren Isomere [Wittig et al., 2003; Enzensperger, 2007; Enzensperger et al., 2007b]. Als Leitstruktur diente hier das von Schweikert dargestellte hochaffine Dibenz[*d,g*]azecin LE404 [Schweikert, 1999; Hoefgen et al., 2006]. Im

Rahmen dieser Arbeit sollten Isomere der bekannten Dibenz[*g,j*]-1-oxa-4-azacycloundecane WW60 und WW84 oder – anders betrachtet – sauerstoffhaltige Analoga der Dibenz[*d,g*]oxazacycloundecane CE570 und CE571 dargestellt und pharmakologisch charakterisiert werden (siehe Abbildung B-2).

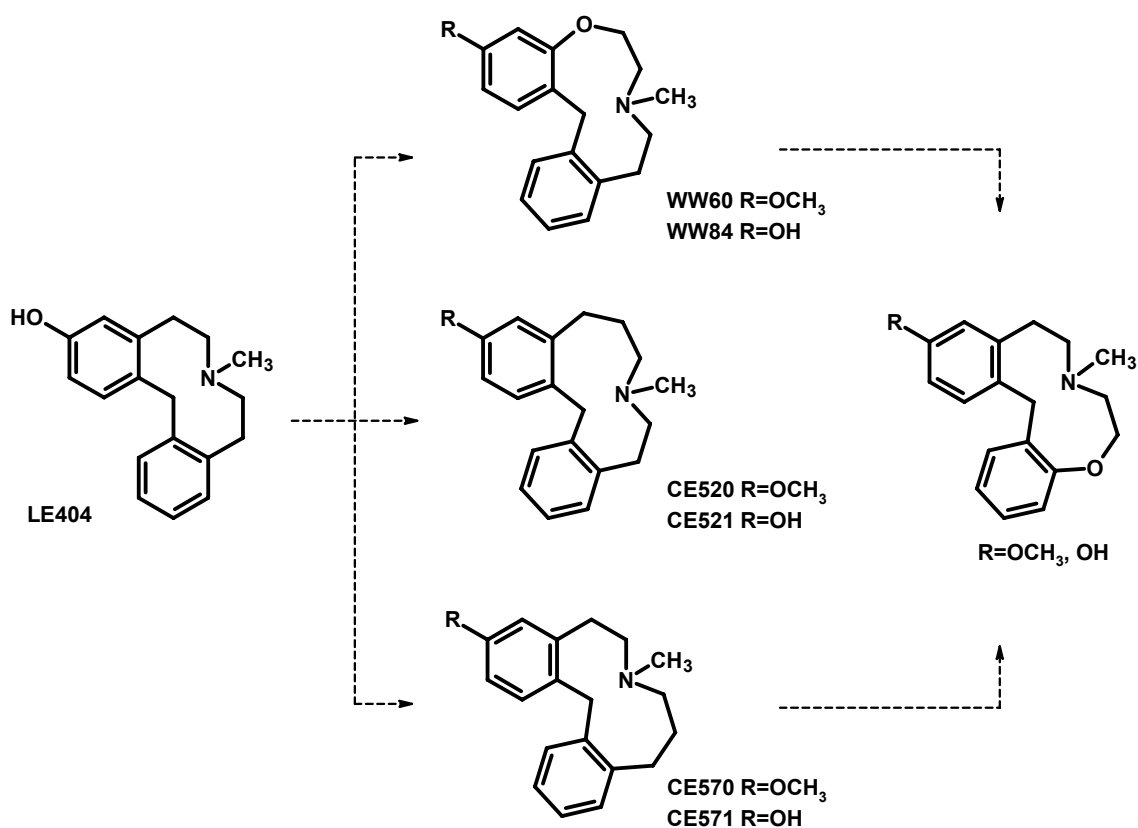


Abbildung B-2 Leitstruktur der Dibenz[*d,g*]azecine, ringerweiterte Homologe und geplante Isomere

B.1.1 Synthese von 8-Methyl-7,8,9,10,15,16-hexahydro-6*H*-indolo[3,2-*g*][1,4]-benzoxazacycloundecan

In Anlehnung an die für LE300 [Witt et al., 2000] und CE560 [Enzensperger, Lehmann, 2006] beschriebenen Synthesen wurde Tryptamin mit dem in Abbildung B-3 dargestellten Lacton zum Hydroxybenzamid FM1 umgesetzt. Nach Bischler-Napieralski-Zyklisierung mit Phosphorylchlorid und Natriumborhydrid-Reduktion des resultierenden cyclischen Iminiumsalzes wurde die pentacyclische Vorstufe FM5 erhalten. Methylierung des basischen Stickstoffs zum quartären Salz FM6 und Spaltung der zentralen C-N-Bindung unter Birch-Bedingungen, mit elementarem Natrium in flüssigem Ammoniak, führte zur Zielverbindung FM7 (siehe Abbildung B-3). Die Zielverbindung FM7 und ihre pentacyclische Vorstufe FM5 wurden pharmakologisch charakterisiert.

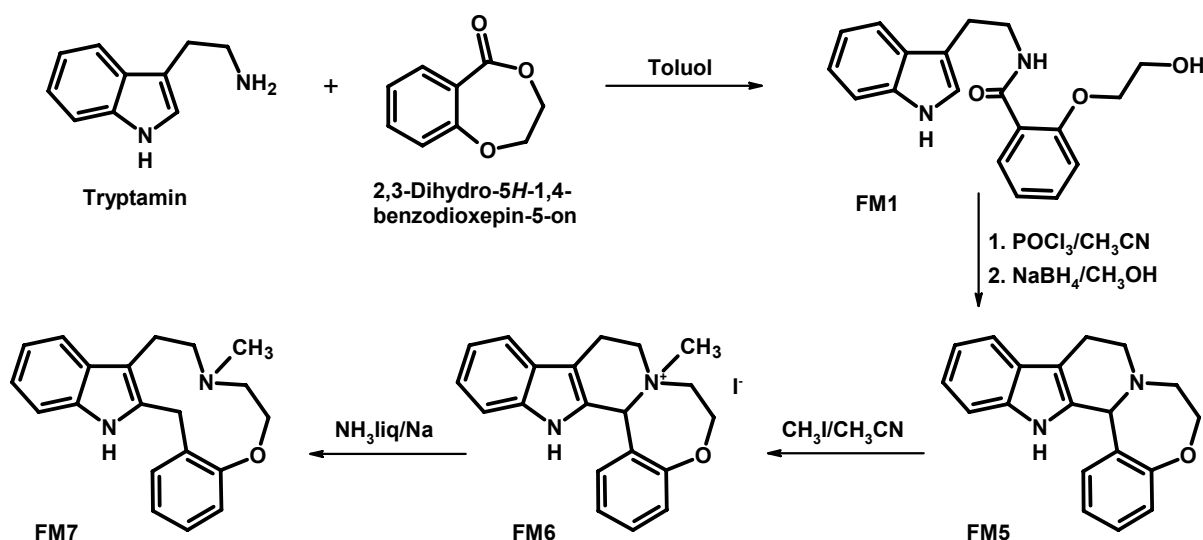


Abbildung B-3 Synthese von 8-Methyl-7,8,9,10,15,16-hexahydro-6H-indolo[3,2-g][1,4]benzoxazacycloundecan (FM7)

B.1.2 Versuche zur Synthese von 12-Methoxy-8-methyl-6,7,8,9,10,15-hexahydrodibenzo[*g,j*][1,4]oxazacycloundecan

Zur Darstellung des Methoxydibenzoxazacycloundecans FM12 (Abbildung B-4) wurde ebenfalls, wie in Absatz B.1.1 beschrieben, zuerst das Hydroxybenzamid FM9 synthetisiert und anschließend über einen doppelten Ringschluss (Bischler-Napieralski-Ringschluss) mit Phosphorylchlorid und reduktive Zyklisierung mit Natriumborhydrid die tetracyclische Vorstufe FM10 erhalten. Dieses als „Hydroxyamidweg“ bekannte Verfahren wurde von Meise und Mitarbeitern zur Darstellung von Dibenzochinolizinen entwickelt [Meise, Müller, 1976].

Das Isochinobenzoxazepin FM7 sollte nun nach der Methode von Witt [Witt et al., 2000] mit Methyljodid quarternisiert und die zentrale C-N-Bindung unter Birch-Bedingungen gespalten werden, um zur Zielverbindung mit 11-gliedrigem zentralen Ring zu gelangen. Dieses Verfahren wurde auch von anderen Mitgliedern des Arbeitskreises angewendet, beispielsweise zur Darstellung von Benzindolo- und Dibenz[*d,g*]azecinen [Schweikert, 1999; Mohr, 2005; Enzensperger, 2007] oder ringerweiterten Dibenz- und Benzindoloverbindungen [Wittig, 2004; Enzensperger, 2007]. Die Iodide der methylierten Dibenz[*a,h*]chinolizine von Schweikert und Mohr kristallisierten nach 18 Stunden bei Raumtemperatur aus Aceton. Enzensperger erhielt quarternisierte Dibenzchinolizine und ringerweiterte Homologe nach 48-stündigem Rühren bei 40°C in Acetonitril. Wittig konnte erst nach längerem Erhitzen in siedendem Toluol (Kp. 111°C) methylierte Oxahomologe der Dibenzazecine gewinnen.

Es wurden sowohl in Aceton, als auch in Acetonitril, jeweils bei Raumtemperatur und unter Rückfluss Methylierungsversuche durchgeführt, die jedoch erfolglos verliefen. Auch unter drastischen Bedingungen in siedendem Toluol mit Methyljodid im Überschuss gelang es nicht, das Isochinobenzoxazepin FM10 in verwertbarer Ausbeute zu methylieren. Die Verwendung anderer Alkylantien wie Methyltriflat in Nitrometan [Hansen, 1965] und

Dimethylsulfat in Acetonitril/Toluol oder Acetonitril/tert-Butylmethylether (in Anlehnung an Basova [Basova, 1982]), führte ebenfalls nicht zum Erfolg.

Eine in diesem Fall vielversprechende Alternative zum oben beschriebenen Verfahren ist der von Enzensperger angewendete „Urethan-Weg“ [Calverley, 1983; Enzensperger et al., 2007b]. Dabei wurde das Isochinobenzoxazepin FM7 mit Chlorameisensäureethylester quarternisiert und ohne Aufarbeitung des Zwischenproduktes die C-N-Bindung mit Natriumcyanoborhydrid zum Urethan FM13 gespalten. Anschließend erfolgte die Reduktion des Urethans zur N-Methylverbindung FM12. Die Entstehung der Zielverbindung FM12 konnte massenspektrometrisch nachgewiesen werden. Es gelang jedoch nicht, das Produkt in zufriedenstellender Reinheit zu gewinnen, so dass auf die Angabe analytischer Daten und pharmakologischer Ergebnisse verzichtet werden muss.

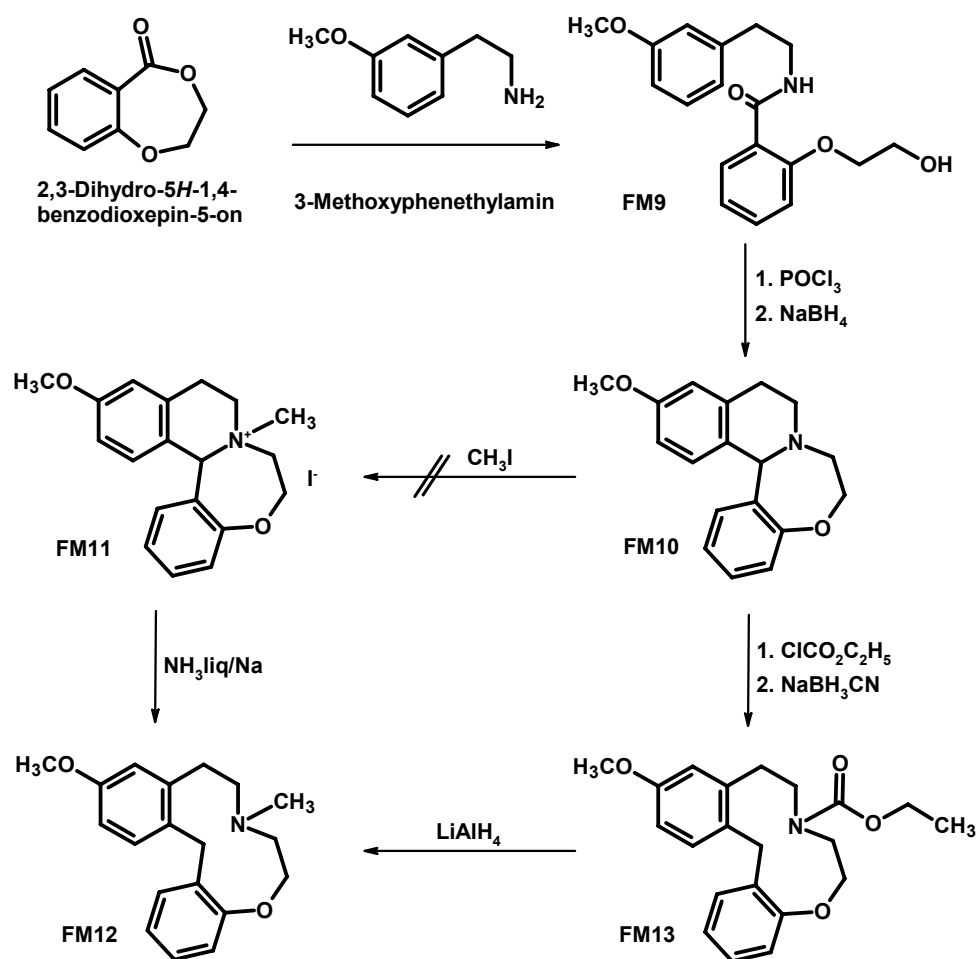


Abbildung B-4 Synthese von 8-Methyl-7,8,9,10,15,16-hexahydro-6H-indolo[3,2-g][1,4]benz-oxazacycloundecan (FM12)

B.1.3 Versuche zur Synthese von 8-Methyl-6,7,8,9,10,15-hexahydro-dibenzo[*g,j*]-[1,4]oxazacycloundecan-12-ol

Analog zum in Abschnitt B.1.2 beschriebenen Syntheseweg für die Methoxyverbindung FM12 sollten Lacton und Amin zum entsprechenden Hydroxyamid umgesetzt, dieses nach Zyklisierung mit Phosphorylchlorid und Natriumborhydrid am Stickstoff methyliert werden und die C-N-Bindung des quartären Salzes unter Birch-Bedingungen geöffnet werden.

Da der Methylierungsschritt nicht nur den tertiären Stickstoff, sondern auch die phenolische Hydroxygruppe erfassen würde, muss eine Schutzgruppe eingeführt werden.

Wie bei Wittig zur Darstellung des Hydroxydibenzoxazacycloundecans WW84 (siehe Abbildung B-2) beschrieben [Wittig, 2004], wurde ein Benzylrest zum Schutz der Hydroxygruppe verwendet, da dieser sich parallel zur Ringspaltung unter Birch-Bedingungen entfernen lässt. Die Schutzgruppe wurde bereits vor der Aminolyse des Lactons zum Hydroxyamid eingeführt.

McNulty beschrieb die Darstellung des 3-Benzylxyphenylethylamins FM3 aus 3-Benzylxybenzaldehyd über eine Henry-Reaktion mit Nitromethan und anschließender Reduktion des entstandenen 3-Benzylxynitrostyrens zum Amin [McNulty et al., 1998] (siehe Abbildung B-5).

Zur Kondensation von Nitroalkanen mit aromatischen Aldehyden zu Nitroalkenen wird üblicherweise eine Lösung des Aldehyds in Eisessig mit dem entsprechenden Nitroalkan und Ammoniumacetat einige Stunden auf 100°C erhitzt. McNulty und Mitarbeiter führten die Reaktion mit verschiedenen Aldehyden und Nitroalkanen bei Raumtemperatur im Ultraschallbad durch und erreichten bemerkenswerte Ausbeuten. Ding et al. [Ding et al., 2005] arbeiteten in Nitromethan mit Ammoniumacetat Zusatz, ohne den Aldehyd in Eisessig zu lösen und erhielten nach einstündigem Refluxieren bei 100°C eine Ausbeute von 90% 3-Benzylxynitrostyren.

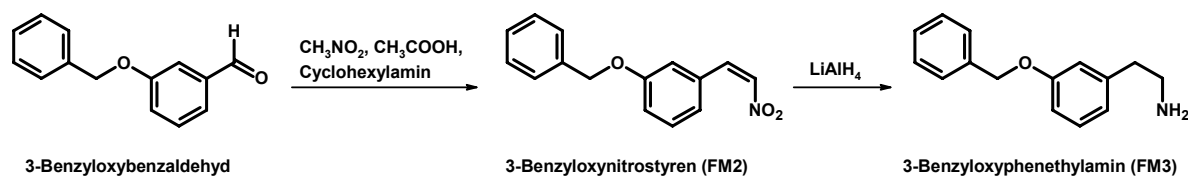


Abbildung B-5 Synthese von benzyliertem 3-Hydroxyphenylethylamin

Die Syntheseveruche zur Darstellung des 3-Benzylxynitrostyrens (FM2) verliefen sowohl nach McNulty unter Ultraschall Einfluss, als auch unter den von Ding beschriebenen Reaktionsbedingungen erfolglos. Bei beiden Varianten wurde das Edukt unverändert isoliert. Enzensperger verwendete in Anlehnung an Shulgin [Shulgin, Shulgin, 1995] in ähnlichen, bisher unveröffentlichten Experimenten Cyclohexylamin anstelle von Ammoniumacetat. Lösen des Benzylxybenzaldehyds in Essigsäure, Zusatz von Nitromethan und

Cyclohexylamin und 2½ stündiges Erhitzen auf 100°C ergab eine Ausbeute von 41% Benzyloxynitrostyren (FM2), die auch durch längeres Erhitzen nicht gesteigert werden konnte.

Die Reduktion des Nitrostyrens zum Phenylethylamin wurde nach Trachsel [Trachsel et al., 2006] mit Lithiumaluminiumhydrid/Schwefelsäure durchgeführt.

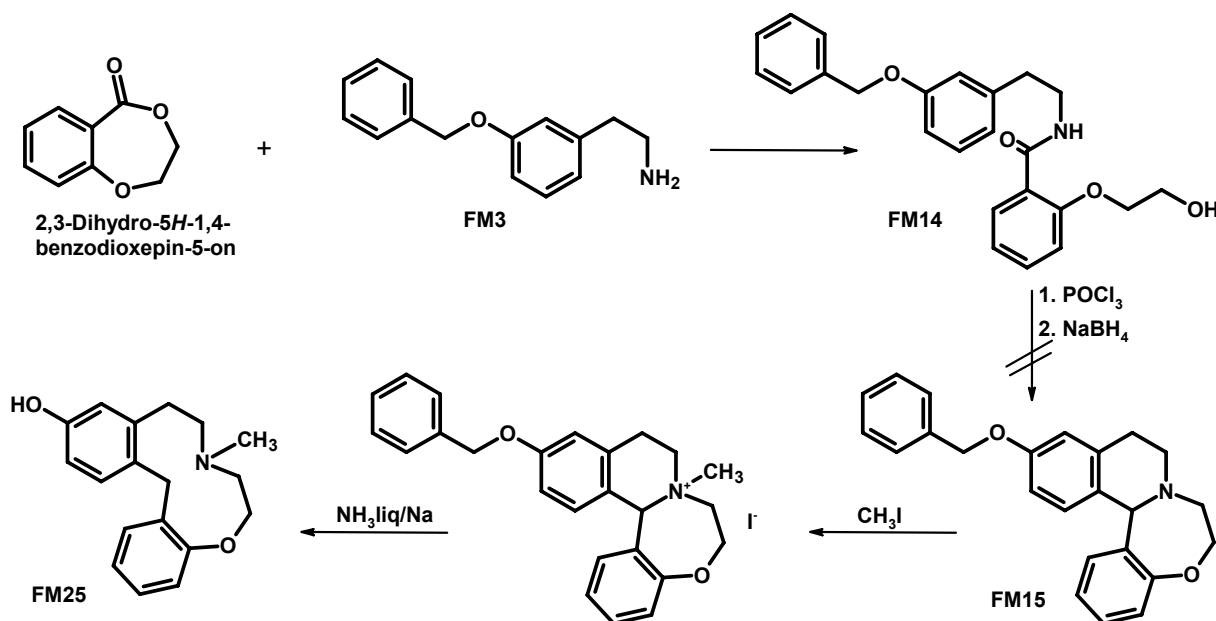


Abbildung B-6 geplanter Syntheseweg des Hydroxyoxazacycloundecans FM25

Das Hydroxybenzamid FM14 konnte wie geplant aminolytisch aus Lacton und Benzyl-oxyphenylethylamin (siehe Abbildung B-6) in einer Ausbeute von 56% gewonnen werden. Allerdings führte die anschließende Umsetzung mit Phosphorylchlorid und Natriumborhydrid zu einem nicht aufklärbaren und nicht aufzureinigenden Produktgemisch.

Meise, Schlüter und Wittig [Meise, Schlüter, 1987; Schlüter, Meise, 1988; Wittig, 2004] schützten, zur Vermeidung unerwünschter Nebenprodukte, vor dem Ringschluss die Hydroxygruppe durch Umsetzung mit Chlorameisensäureethylester.

Die Veresterung der Hydroxygruppe zum Kohlensäureester (FM28), der erste Ringschluss mit Phosphorylchlorid zum Dihydroisochinolin (FM29) und die Esterspaltung zur entschützten Hydroxyverbindung FM30 verliefen problemlos (Abbildung B-7). Die Umsetzung mit Phosphorylchlorid und Natriumborhydrid zur tetracyclischen Verbindung FM15 blieb jedoch auch auf diesem Weg ohne Erfolg, da auch hier ein Produktgemisch entstand, welches nicht aufzureinigen war. Die Synthese der tricyclischen Zielverbindung konnte daher nicht realisiert werden.

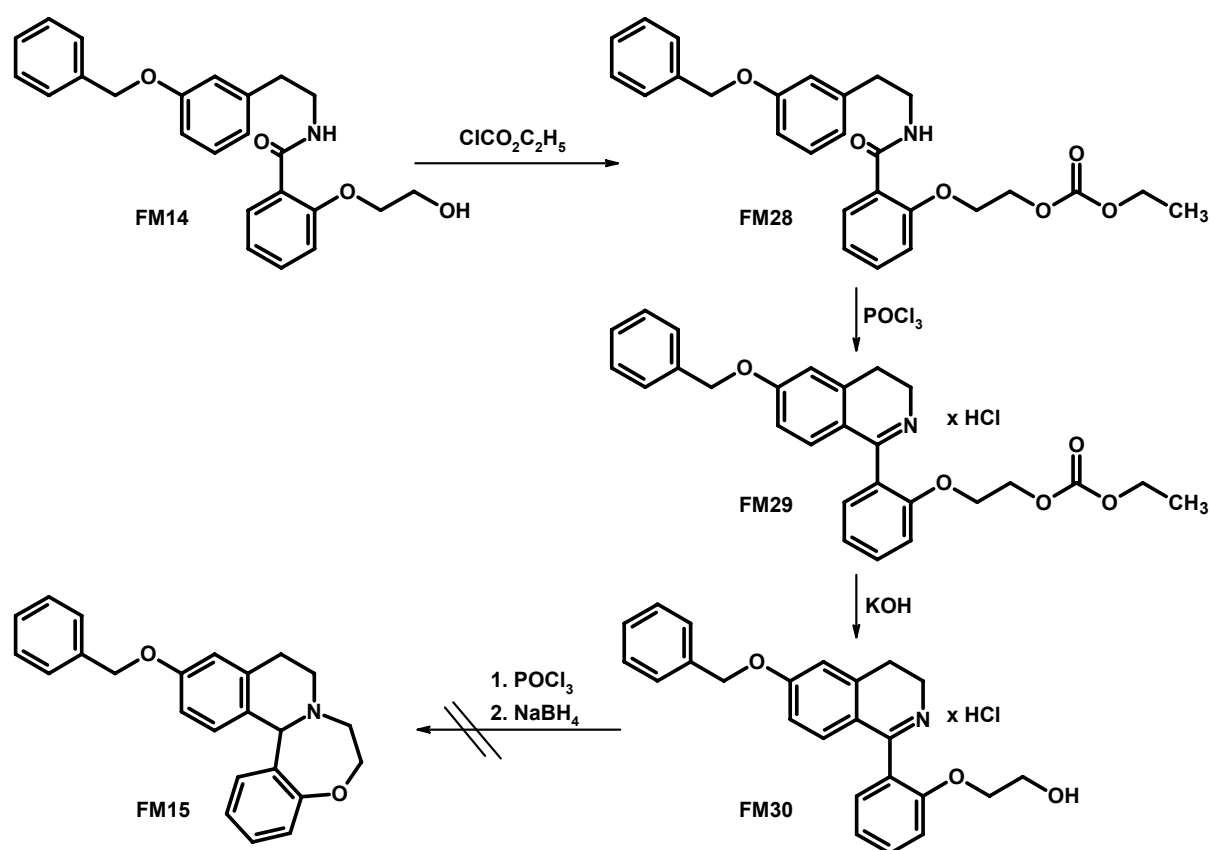


Abbildung B-7 Versuch der Synthese der tetracyclischen Zwischenstufe FM15

B.2 Arylpiperazine

B.2.1 Arylpiperazinderivate mit Lactamfunktion

Moleküle in denen ein aromatisches System über eine Butylamidkette mit einem Arylpiperazin verbunden ist, sind potente Dopaminrezeptorliganden, die bevorzugt am D_3 Rezeptor binden.

Nun sollte untersucht werden, wie sich das Bindungsprofil von Strukturen verhält, wenn die Amidfunktion in einen Heterocyclus eingebunden ist, statt exocyclisch in der Butylamidkette vorzuliegen. Abadi (Cairo University, Kairo, Ägypten) stellte dazu einen Satz von 20 Verbindungen zur Verfügung, in denen verschiedene Heterocyclen, die cyclische Amide (Lactame) enthalten (Saccharin, Phthalazinon, Chinazolinon, Indolinon und Isoindolinon), über eine Butylkette mit unsubstituiertem Phenylpiperazin oder substituierten Phenylpiperazinen (2-Methoxy-, 4-Chlor-, 3-Trifluormethylphenylpiperazin) verbunden sind. Außerdem wurden im Arbeitskreis Abadi nach dem gleichen Muster vier Verbindungen mit einem 1,2-Benzisothiazol-1,1-dioxid Heterocyclus synthetisiert, die keine Amidfunktion enthalten (Tabelle B-1).

Zusätzlich zu den in Kairo durchgeführten NMR Untersuchungen sollten vor Beginn der pharmakologischen Untersuchungen die Strukturen der Verbindungen mittels GC/MS und HRMS gesichert werden.

Die GC/MS Untersuchungen konnten nicht mit allen Verbindungen durchgeführt werden, da die Detektionsgrenze des verwendeten massenselektiven Detektors bei einer Masse von 425g/mol liegt. Größere Massen können nicht detektiert werden. Die Molmassen der Verbindungen AHA-F5, AHA-F6 und der trifluormethylsubstituierten Substanzen AHA-F3, AHA-F7, AHA-F11, AHA-F15 liegen oberhalb der Detektionsgrenze von 425g/mol. Hochauflösende Massenspektren wurden von allen 24 Verbindungen aufgenommen.

Angaben zur Synthese der Verbindungen und die genauen analytischen Daten sind der Literatur zu entnehmen [Awadallah et al., 2007].

Arylrest R	Substanzcode					
	AHA-F1	AHA-F5	AHA-F9	AHA-F13	AHA-F17	AHA-F21
	AHA-F2	AHA-F6	AHA-F10	AHA-F14	AHA-F18	AHA-F22
	AHA-F3	AHA-F7	AHA-F11	AHA-F15	AHA-F19	AHA-F23
	AHA-F4	AHA-F8	AHA-F12	AHA-F16	AHA-F20	AHA-F24

Tabelle B-1 Arylpiperazine mit Lactamstruktur und Arylpiperazine mit 1,2-Benzisothiazol- 1,1-Dioxid-Heterocyclus (Strukturen der grau schattierten Verbindungen konnten nicht bestätigt werden)

B.2.1.1 2-[4-(4-Phenylpiperazin-1-yl)butyl]-2,3-dihydro-1,2-benzisothiazol-1,1-dioxide und -phthalazin-1(2H)-one

Die berechneten Massen der 1,2-Benzisothiazol1,1-dioxid Verbindungen AHA-F1 bis AHA-F4 und der Phthalazin-1(2H)-one AHA-F9 bis AHA-F12 konnten in den hochauflösenden Massenspektren nicht nachgewiesen werden. Auch in den GC/MS Spektren war der

gewünschte Molpeak nicht sichtbar. Die Struktur der acht Verbindungen konnte demnach nicht bestätigt werden.

Auch in einer zweiten Charge der vier Phthalazin-1(2*H*)-on Zielverbindungen AHA-F9 bis AHA-F12 konnte die vermeintliche Struktur nicht nachgewiesen werden. Diese beiden Verbindungssätze standen daher für die pharmakologischen Experimente nicht zur Verfügung.

B.2.1.2 2-[4-(4-Phenylpiperazin-1-yl)butyl]-2,3-dihydro-1,2-benzisothiazol-3(2*H*)-on-1,1-dioxide, -chinazolin-4(3*H*)-one, und -1,3-dihydro-2*H*-indol-2-one

Die zwölf Strukturen dieser drei Verbindungssätze konnten bestätigt werden. In den hochauflösenden Massenspektren der 2,3-Dihydro-1,2-benzisothiazol-3(2*H*)-on-1,1-dioxide AHA-F5 bis AHA-F8, der Chinazolin-4(3*H*)-one AHA-F13 bis AHA-F16 und der 1,3-Dihydro-2*H*-indol-2-one AHA-F17 bis AHA-F20 wurden jeweils die berechneten Massen nachgewiesen. Von den Verbindungen AHA-F8, AHA-F13, AHA-F14, AHA-F16 und AHA-F17 bis AHA-F20 wurde zusätzlich ein GC/MS aufgenommen, welches Reinheit und Struktur der gewünschten Verbindungen sicherte. Die Molmassen der weiteren genannten Verbindungen mit diesen Grundstrukturen überschritten die Detektionsgrenze von 425g/mol. Mit allen in diesem Abschnitt erwähnten untersuchten Verbindungen konnten demnach pharmakologische Experimente durchgeführt werden [Awadallah et al., 2007].

B.2.1.3 2-[4-(4-Phenylpiperazin-1-yl)butyl]-isoindolin-1-one

Von allen vier Verbindungen wurde ein GC/MS aufgenommen. Es wurde jedoch nur bei der unsubstituierten Verbindung AHA-F24 und der trifluormethylierten Substanz AHA-F23 ein der erwarteten Molmasse entsprechendes Signal detektiert, jedoch mit sehr geringer Intensität. In allen Spektren finden sich Massensignale, die charakteristischen Fragmenten der gewünschten Verbindungen entsprechen. Es ist daher anzunehmen, dass die Verbindungen sehr leicht in die entsprechenden Fragmente zerfallen, so dass im Massenspektrum kein oder nur ein sehr kleiner Molpeak zu erkennen ist. In den hochauflösenden Massenspektren der Substanzen konnten bei drei Verbindungen die berechneten Massen nachgewiesen werden. Für die Methoxy Verbindung AHA-F21 konnte jedoch auch im HRMS die berechnete Masse nicht detektiert werden. Da das ¹H-NMR Spektrum und die elementaranalytischen Daten von Abadi für die Existenz dieser Verbindung sprachen, wurde das Phenylpiperazinylbutylisoindolinon AHA-F21 neben den anderen drei Phenylpiperazinylbutylisoindolinonen (AHA-F22 bis AHA-F24) in den Verbindungssatz für das pharmakologische Screening aufgenommen [Awadallah et al., 2007].

B.2.2 Weitere Arylpiperazine

Von Abou El Ella (Ain Shams University, Kairo, Ägypten) erhielt der Arbeitskreis Lehmann weitere Verbindungen mit Arylpiperazin Struktur [Abou El Ella, Müller, 2007], deren Bindungsverhalten und Wirkung in vitro am 5-HT_{2A} Rezeptor und den verschiedenen Dopaminrezeptorsubtypen untersucht werden sollten. Wie auch bei den schon erwähnten Verbindungen vom Arylpiperazintyp ist das Grundmuster dieser Verbindungen eine aromatische oder heteroaromatische Komponente, die über einen Spacer mit einer basischen Arylpiperazin Struktur verbunden ist. Als Leitstrukturen dienten die bereits in der Einleitung besprochenen D₃ selektiven Verbindungen BP897, FAUC365, NGB2904 und GR103691 (Abbildung A-9).

B.2.2.1 *N*-(1,3-Benzothiazol-2-yl)-2-(4-phenylpiperazin-1-yl)acetamide

Im Gegensatz zum recht flexiblen Butylamidspacer der Leitstrukturen besitzen die in Abbildung B-8 dargestellten Verbindungen einen weniger beweglichen, semi-rigiden Acetamidspacer. Als aromatische Komponente wurde 6-Chloro-1,3-benzothiazol verwendet. Der Phenylpiperazinrest ist entweder unsubstituiert (AD6) oder trägt in *m*-Stellung einen Trifluormethylrest (AD10b), an Position 2 eine Methoxygruppe (AD12) oder einen *p*-Nitro Substituenten (AD15).

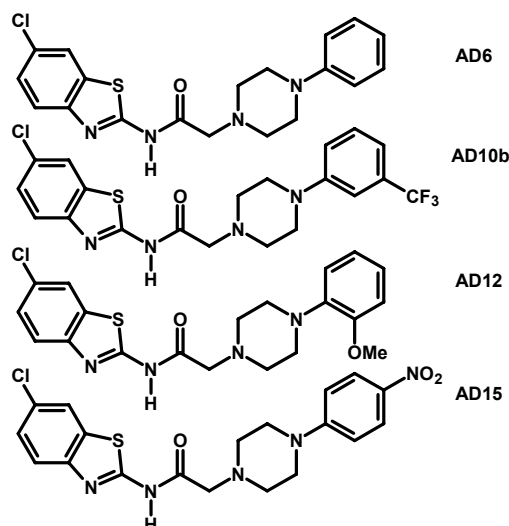


Abbildung B-8 Arylpiperazine mit semi-rigidem Spacer, *N*-(6-chloro-1,3-benzothiazol-2-yl)-2-(4-phenylpiperazin-1-yl)acetamide

Ergänzend zur 2-Methoxyphenyl Verbindung AD12 wurden zwei weitere 2-Methoxyphenyl Verbindungen mit abweichender Substitution in 6-Stellung des 1,3-Benzothiazolrestes (Abbildung B-9) zur Verfügung gestellt. Verbindung AD30 trägt eine Nitrogruppe und Verbindung AD34 ist methylsubstituiert.

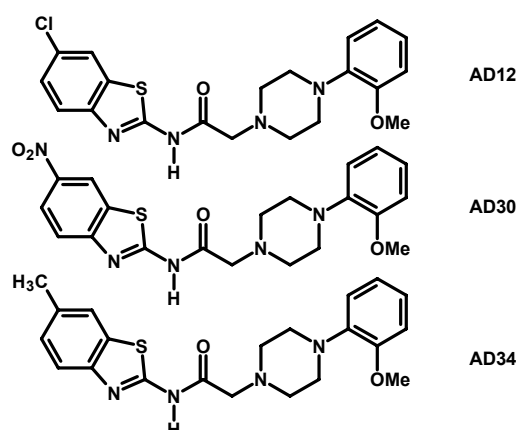


Abbildung B-9 N-(1,3-benzothiazol-2-yl)-2-(4-(2-methoxyphenyl)piperazin-1-yl)acetamide

B.2.2.2 Thiopropylphenylpiperazine mit verschiedenen bioisosteren Heteroaromaten

Zusätzlich sollte ein Satz von Verbindungen untersucht werden, deren aromatisches System über eine Thiopropylstruktur mit der basischen Arylpiperazinkomponente verknüpft ist (Abbildung B-10). Die Thiopropylkette stellt eine sehr bewegliche Verbindung zwischen den Strukturelementen dar. Im Gegensatz zu den Leitstrukturen und allen bisher betrachteten Arylpiperazinen fehlt in diesen Verbindungen die Amidstruktur, die in den restlichen zu untersuchenden Verbindungen entweder in den Heteroaromaten eingebunden ist oder exocyclisch vorliegt. Als heterocyclische Komponenten wurden 1,3-Benzoxazol (AD25, AD29), 1,3-Benzothiazol (AD24, AD27) und 1H-Benzimidazol (AD31) verwendet. Diese Verbindungen gelten als bioisoster. Die Phenylpiperazinstruktur trägt jeweils ein Chloratom in *p*-Stellung. Die 1,3-Benzoxazol und 1,3-Benzothiazol Verbindungen stehen außerdem auch mit unsubstituiertem Phenylrest zur Verfügung (AD25 und AD24).

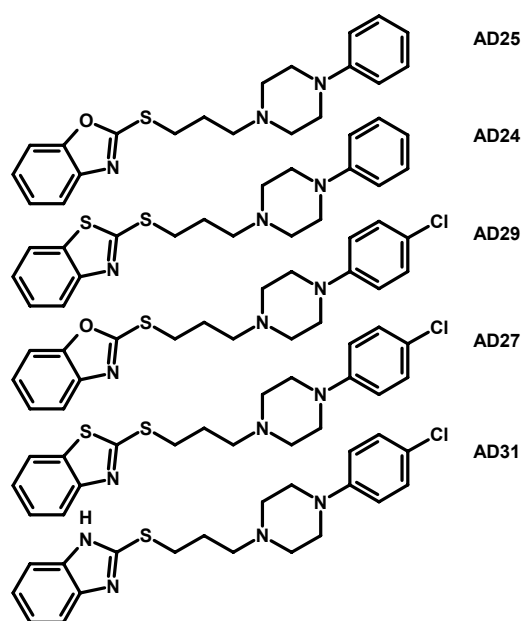


Abbildung B-10 Verbindungen mit flexiblem Thiopropylspacer

B.3 Apomorphinderivate

Sipos und Mitarbeiter untersuchen seit einigen Jahren die Möglichkeiten und Einflüsse neuer Substitutionsmuster und Heterocyklenformationen am Apomorphingrundgerüst.

Um weitere Erkenntnisse zu den Bindungseigenschaften dieser Moleküle zu gewinnen, wurden verschiedene, am A-Ring modifizierte Apomorphinderivate zur pharmakologischen Charakterisierung zur Verfügung gestellt.

B.3.1 Neue heterocyclische Strukturen am Apomorphingrundgerüst

Die pharmakologische Besonderheit der Apomorphine mit neuen 5- oder 6-gliedrigen anellierten Aromaten am A-Ring des Apomorphingerüsts (Abbildung B-11, Abbildung B-12) ist deren sterische Ähnlichkeit zu den 2- und 3-Alkyl- und Arylapomorphinen, welche hervorragende Dopamin D₂ Rezeptoraffinitäten besitzen [Sondergaard et al., 2005; Sipos et al., 2008b]. Diese bemerkenswerten D₂ Affinitäten werden spezifischen lipophilen Wechselwirkungen zwischen Substituenten in 2- und 3-Position und einer Oberflächenvertiefung des D₂ Rezeptorproteins in der Umgebung der Bindungsstelle zugeschrieben [Zhang et al., 2007a; Zhang et al., 2007b].

Synthesen und analytische Daten der nachfolgend dargestellten Verbindungen sind in der Literatur beschrieben [Sipos et al., 2009a; Sipos et al., 2009b].

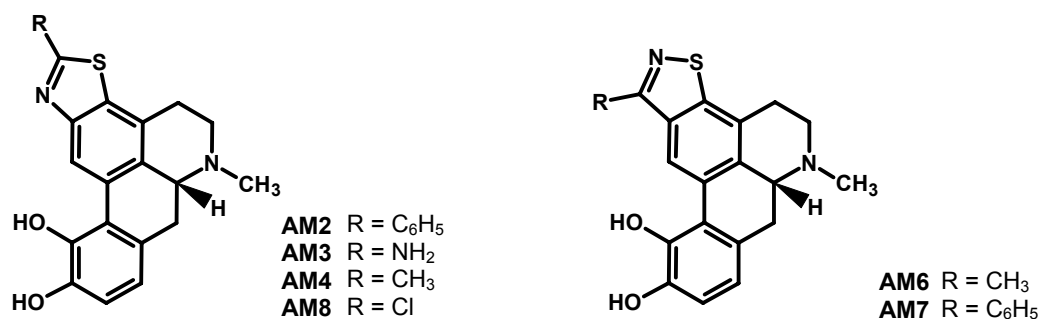


Abbildung B-11 Apomorphinderivate mit Thiazol- und Isothiazolstruktur

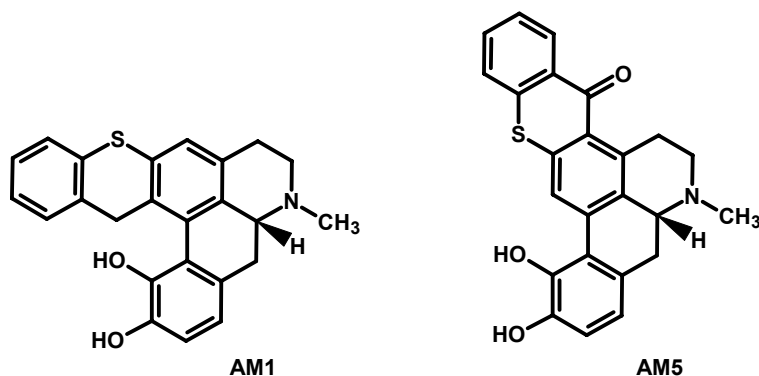


Abbildung B-12 Apomorphinderivate mit Thiochroman- und Thiochochromanonstruktur

B.3.2 2-Hydroxyapomorphine mit Benzylsubstituenten in 1-Stellung

Bei diesem Satz von Verbindungen handelt es sich um Derivate mit neuartigem Substitutionsmuster, da zusätzlich zur Hydroxysubstitution in Position 2 auch in 1-Stellung Substituenten eingeführt wurden. Eine Methylsubstitution sollte mit verschiedenen, sterisch anspruchsvollen Benzylsubstituenten verglichen werden.

Eine Publikation mit synthetischen, analytischen und pharmakologischen Daten dieser Verbindungen ist in Vorbereitung.

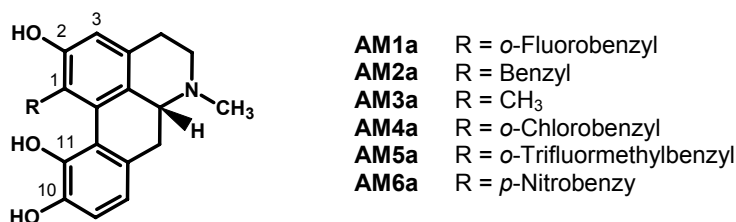


Abbildung B-13 2-Hydroxyapomorphine mit Substituenten in 1-Stellung

Ein *m*-Substituent am Ring A des Apomorphingrundgerüsts (Position 2) scheint essentiell für die D₂ Affinität der Derivate zu sein. Auch größere Substituenten wie Hydroxyphenyl werden hier ohne Wirkungsverlust toleriert [Sondergaard et al., 2005], während ausschließlich in *o*-Position des A-Ringes (Position 3) substituierte Verbindungen keinerlei Dopaminaffinität zeigen [Berenyi et al., 2001; Zhang et al., 2007b].

C PHARMAKOLOGISCHER TEIL – METHODEN UND MATERIALIEN

C.1 Zelllinien und Zellkultur

Alle in den folgenden Abschnitten beschriebenen Arbeiten mit lebenden Zellen wurden unter aseptischen Bedingungen an einer Werkbank mit laminarem Luftstrom (Fa. Holten, Allerød, Dänemark) durchgeführt. Für alle aseptischen Arbeiten wurden sterile Kunststoff Einwegpipetten (Greiner Bio-One, Frickenhausen) benutzt. Zusätzlich zu den im Folgenden beschriebenen gentechnisch veränderten Organismen wurden für einige Experimente HEK293 (Human embryonic kidney) Wildtyp Zellen verwendet, die H. Bönisch (Bonn) freundlicherweise zur Verfügung stellte.

C.1.1 Eingesetzte gentechnisch veränderte Organismen

Für die Durchführung der Bindungsexperimente wurden HEK293 und CHO (Chinese hamster ovary) Zelllinien verwendet, die humane, klonierte Dopamin und Serotonin Rezeptorsubtypen exprimieren. Durch Subklonierung der entsprechenden humanen DNA in einen Expressionsvektor, transfizieren des erhaltenen Plasmids in Wirtszellen und klonale Selektion der Zellen konnten stabil transfizierte Zelllinien erhalten werden. Auf diesem Wege gelang es B. Höfgen im Arbeitskreis Lehmann, HEK D₁, HEK D_{2L} und HEK D₅ Zelllinien herzustellen. [Hoefgen, 2002; Kassack et al., 2002b]. Weitere Zelllinien wurden dem Arbeitskreis dankenswerterweise von folgenden Kooperationspartnern zur Verfügung gestellt:

- HEK D₃ und HEK 5-HT_{2A}: M. Kassack (Düsseldorf)
- CHO D_{2L}: J. Shine (Darlinghurst, Australien)
- CHO D₃: H. Stark (Frankfurt)
- CHO D_{4.4}: H. Van Tol (Toronto, Kanada)

C.1.2 Kultur und Vermehrung der Zellen

Zur Inkulturnahme der Zellen wurde eine Gewebekulturflasche mit Filterdrehverschluss und 175cm² Bodenfläche (Greiner Bio-One, Frickenhausen) mit 20ml auf 37°C temperierten Nährmedium befüllt. Anschließend wurde dem Stickstofftank ein Cryoröhrchen (Greiner Bio-One, Frickenhausen) mit 1ml Zellsuspension der entsprechenden Zelllinie entnommen, bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und die aufgetaute Zellsuspension unverzüglich mit einer sterilen Pipette direkt in das vorgelegte Nährmedium überführt. Die Zellen wurden in einem Begasungsbrutschrank (CB 150, Binder, Tuttlingen) bei 37°C in einer mit 5% Kohlendioxid angereicherten Atmosphäre inkubiert. Die Zusammensetzung des Nährmediums ist Tabelle C-1 zu entnehmen. Das Nährmedium wurde bei frisch ausgesäten Kulturen das erste Mal

nach 24 Stunden gewechselt, um beim Einfrieren zugesetztes Dimethylsulfoxid (siehe Kapitel C.1.3) zu entfernen. Im weiteren Kulturverlauf waren die Zellen spätestens nach 48 Stunden mit frischem Nährmedium zu versetzen (Mediumwechsel oder Teilung der Kultur). Die Zellen bildeten in den Gewebekulturflaschen einen einschichtigen adhärennten Zellrasen aus. Nach 48 bis 72 Stunden hatten die Zellen in der Regel eine Konfluenz von 90% erreicht und konnten passagiert (Teilung der Zellkultur zur Vermehrung) oder zur Herstellung einer Ganzzellsuspension (siehe Kapitel C.2.2.1 und C.3.2.1) für die Experimente verwendet werden.

Bestandteil		Volumen	End-	Lieferant
HEK	CHO	[ml]	konzentration	
Dulbecco's Modified Eagle's Medium/ Nutrient Mixture F-12 Ham 1:1	Nutrient Mixture F-12 Ham	500		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Fetales Kälberserum (FKS Gold)		50	10%	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
L-Glutamin (200mM)		2,5	1mM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Geneticindisulfat G418		1	0,2µg/ml	PAA Laboratories GmbH, Cölbe

Tabelle C-1 Zusammensetzung des Nährmediums für HEK und CHO Zelllinien (für HEK Wildtyp ohne Selektionsantibiotikum G418)

Zum Passagieren der Kultur wurde zunächst das verbrauchte Nährmedium mittels einer Vakuumpumpe (Absaugsystem AF 204, HLT, Bovenden) abgesaugt. Dann wurden die Zellen mit 3ml einer zimmerwarmen Trypsin/EDTA-Lösung 0,5/0,2% (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) benetzt und nach 1- bis 3-minütiger Einwirkzeit, durch Klopfen gegen die Seitenwand, vom Boden der Kulturflasche abgelöst. Anschließend wurde 6ml frisches Nährmedium zugesetzt, um die Trypsin/EDTA-Lösung zu inaktivieren und die Zellen von der Platte zu spülen. Die erhaltene Zellsuspension wurde in ein steriles 50ml Zentrifugenröhrchen (Polypropylen, Greiner Bio-One, Frickenhausen) überführt und 4 Minuten bei 4°C und 1800rpm zentrifugiert (Allegra 64R, Rotortyp C0650, Beckman Coulter, Krefeld). Währenddessen wurden frische Kulturflaschen mit je 20ml 37°C warmem Medium befüllt. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet in 6ml oder 9ml (siehe unten) frischem Medium resuspendiert und je nach Bedarf auf zwei oder drei Kulturflaschen verteilt. Dabei wurden pro Kulturflasche 3ml der Zellsuspension in das vorgelegte Nährmedium pipettiert. Wenn die Zellen nicht zu Klumpenbildung neigten und

sich leicht von der Platte klopfen ließen, konnte auf das Trypsinieren verzichtet werden. In dem Fall wurden die Zellen durch Klopfen auf die Seitenwand der Kulturflasche abgelöst, im verbrauchten Nährmedium suspendiert und – wie bereits beschrieben – zentrifugiert und weiter verarbeitet. HEK Wildtyp und HEK 5-HT_{2A} Zellen ließen sich nicht ohne Trypsin/EDTA-Behandlung von der Platte lösen. Die HEK 5-HT_{2A} Zellen zeigten gegenüber den weiteren kultivierten Zelllinien einen erhöhten Substratbedarf und wurden deshalb in 30ml, statt wie oben beschrieben, in 20ml Nährmedium kultiviert.

C.1.3 Lagerung der Zelllinien

Wie in Kapitel C.1.2 beschrieben, wurde ein Zellpellet gewonnen und in 4ml Nährmedium resuspendiert. Dieser Suspension wurden 10% (v/v) Dimethylsulfoxid zugesetzt, um beim Gefrieren die Bildung großer, zellschädigender Kristalle zu verhindern. Anschließend wurde die Zellsuspension auf vier Cryoröhrchen verteilt und zunächst bei -80°C eingefroren. Nach 24 Stunden wurden die gefrorenen Aliquota in flüssigem Stickstoff eingelagert.

C.2 Radioligandbindungsstudien

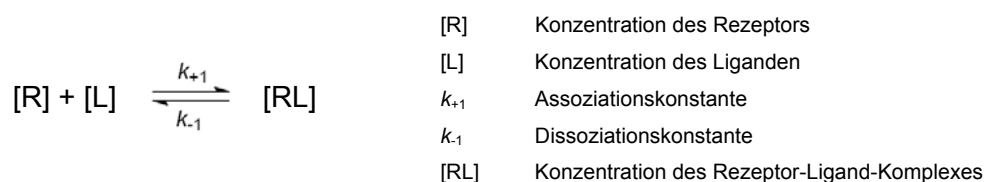
Radioligandbindungsmethoden sind sowohl für Sättigungs- und Konkurrenzexperimente (auch als Inhibitions- oder Verdrängungsexperiment bekannt), als auch für kinetische Untersuchungen geeignet. Prinzipiell wird bei einem Radioligandbindungsexperiment eine Zubereitung, die den gewünschten Rezeptor enthält, mit einem geeigneten Radioliganden über einen bestimmten Zeitraum inkubiert und anschließend die rezeptorgebundene Radioaktivität bestimmt.

Inkubiert man eine gleich bleibende Rezeptormenge mit verschiedenen Radioligandenkonzentrationen und trägt die gebundene Radioaktivität gegen die Radioligandenkonzentration auf, so erhält man eine Sättigungskurve. Aus solchen Experimenten lässt sich die Rezeptordichte (B_{\max}) und die Affinität des Radioliganden zum Rezeptor (Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D) bestimmen. Bleiben Rezeptor- und Radioligandenkonzentration konstant, während die Inkubationszeit variiert wird, gewinnt man Daten zur Kinetik der Rezeptorbindung und kann Geschwindigkeitskonstanten für Bildung und Zerfall des Rezeptor-Ligand-Komplexes berechnen. In dieser Arbeit wurden hauptsächlich Konkurrenzexperimente durchgeführt, mit denen sich die Affinität (Inhibitionskonstante K_i) eines „kalten“ (nicht radioaktiv markierten) Liganden zum Rezeptor bestimmen lässt. Dabei ist die Menge des um die Bindungsstelle konkurrierenden kalten Liganden die einzige veränderliche Variable des Experiments. Man unterscheidet hier zwischen homologer und heterologer Konkurrenz, je nachdem, ob der unmarkierte Ligand die gleiche Struktur wie der Radioligand besitzt oder kalte Liganden anderer Struktur verwendet werden [Bylund, Toews, 1993].

C.2.1 Theoretische Grundlagen

C.2.1.1 Das Massenwirkungsgesetz

Die Grundlage der durchgeführten Radioligandbindungsexperimente ist eine reversible Interaktion eines Liganden (Radioligand oder unmarkierter Ligand) mit einem Rezeptor. Man geht davon aus, dass sich ein Fließgleichgewicht einstellt, welches dem Massenwirkungsgesetz gehorcht und durch folgendes Schema beschrieben werden kann.



Die Formel ist anwendbar auf ein System, in dem L einen kompetitiven Antagonisten darstellt, der die Struktur des Rezeptors nicht nennenswert verändert und dessen Bindung an den Rezeptor reversibel ist. Nach dem Zerfall des Rezeptor-Ligand-Komplexes liegen

sowohl der Rezeptor, als auch der Ligand in ihrer Struktur unverändert vor und alle Rezeptoren des Systems sind für den Liganden gleich gut zu erreichen.

Wenn pro Zeiteinheit genauso viele Rezeptor-Ligand-Komplexe assoziieren wie Rezeptor-Ligand-Komplexe dissoziieren, also Hin- und Rückreaktion mit gleicher Geschwindigkeit ablaufen, befindet sich das System im Gleichgewicht. Die Geschwindigkeitskonstanten k_{+1} und k_{-1} für die Assoziation bzw. Dissoziation des Rezeptor-Ligand-Komplexes sind dann jeweils gleich groß. Entsprechend dem Massenwirkungsgesetz lässt sich die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D nach folgender Gleichung berechnen.

$$K_D = k_{-1} / k_{+1} = [L] \cdot [R] / [RL]$$

Dabei entspricht der K_D -Wert in mol/l der Ligandenkonzentration, bei der die Hälfte aller verfügbaren Rezeptoren besetzt ist.

$$K_D = [L]_{0,5}$$

Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D gibt Auskunft über die Affinität eines Liganden zum Rezeptor. Je kleiner der K_D -Wert, umso höher ist die Konzentration an Rezeptor-Ligand-Komplexen. Ein Ligand mit kleinem K_D -Wert hat eine hohe Rezeptoraffinität. [Motulsky, 1995]

C.2.1.2 Sättigungsexperimente

Um ein Rezeptor-Radioligand-System zu charakterisieren, d.h. Informationen über die Affinität des Radioliganden zum Rezeptor (K_D -Wert) und die Rezeptorkonzentration des Systems (B_{max}) zu gewinnen, werden Sättigungsexperimente durchgeführt. Dazu wird eine konstante Rezeptormenge mit steigenden Radioligandenkonzentrationen inkubiert, bei jeder Konzentration die Gesamtbindung und die unspezifische Bindung bestimmt und die spezifische Bindung nach folgender Beziehung berechnet:

$$\text{Spezifische Bindung} = \text{Gesamtbindung} - \text{Unspezifische Bindung}$$

Als spezifische Bindung bezeichnet man die Bindung des Radioliganden zum gewünschten Rezeptor an der ligandenspezifischen Bindungsstelle. Die Bindung des Radioliganden an anderen möglichen Bindungsstellen wird als unspezifische Bindung bezeichnet. Als Ursache für die unspezifische Bindung kommt die Bindung an Gewebekomponenten (Enzyme, Transporter, andere Rezeptoren) aber auch Glasfaserfilter oder Reaktionsgefäße in Frage. Dabei wird der Hauptteil durch die Bindung an das Filtermaterial verursacht, während die Bindung an das Gewebe eine untergeordnete Rolle spielt. Weitere Gründe können die Aufnahme des Radioliganden in Membranen oder das Zellinnere von intakten Zellen sein. Bestimmt man die Radioligandenbindung in Anwesenheit eines geeigneten kalten Liganden im Überschuss ($100 \cdot IC_{50}$), der die spezifischen Rezeptorbindungsstellen vollständig besetzt, so erhält man die unspezifische Bindung des Radioliganden, da dieser nur noch

unspezifisch binden kann. Der Ligand zur Bestimmung der unspezifischen Bindung sollte chemisch möglichst unterschiedlich zum Radioliganden sein. Auf keinen Fall darf die kalte Version des Radioliganden dafür verwendet werden, da diese an den gleichen unspezifischen Bindungsstellen wie der Radioligand binden würde.

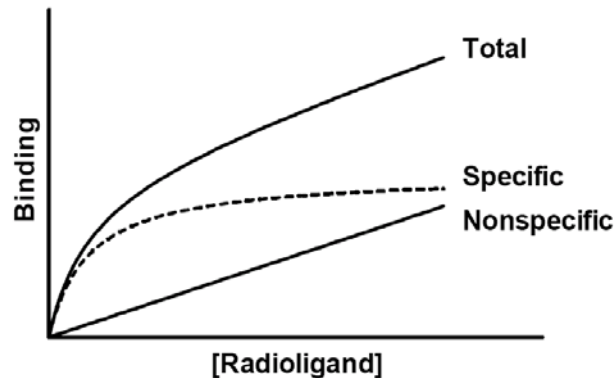


Abbildung C-1 Abhängigkeit der unspezifischen und der spezifischen Bindung (gestrichelte Kurve), sowie der Gesamtbindung von der Radioligandenkonzentration [Motulsky, 1995]

Da nur eine bestimmte Anzahl von Rezeptoren zur Verfügung steht, ist die spezifische Bindung sättigbar, während die unspezifische Bindung linear von der Radioligandenkonzentration abhängt (siehe Abbildung C-1). Als Regel für die Qualität einer Assay Methode gilt in dieser Beziehung: Entfallen 90% der Gesamtbindung auf die spezifische Bindung, so ist die Methode exzellent, 70% spezifische Bindung wird als gut bewertet. Bei einer spezifischen Bindung <50% sollte die Versuchsanordnung geändert werden. [Bylund, Toews, 1993]

Ein Maß für die Rezeptordichte ist der B_{\max} -Wert (maximale Bindungskapazität). Dieser setzt sich zusammen aus der Summe von freien Rezeptoren [R] und Rezeptor-Ligand-Komplexen [RL].

$$B_{\max} = [R] + [RL]$$

Trägt man die spezifischen Bindungen (entsprechen der Konzentration des Rezeptor-Ligand-Komplexes [RL]) aus einem Sättigungsexperiment gegen die Konzentration an ungebundenem Radioliganden [L] auf, erhält man eine Bindungsisotherme, die sich asymptotisch mit steigender Radioligandenkonzentration der maximalen Bindungskapazität (B_{\max}) annähert (Abbildung C-2).

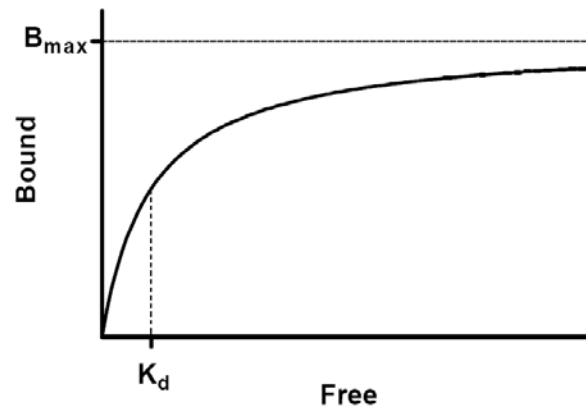


Abbildung C-2 Sättigungskurve, x-Achse: Konzentration des ungebundenen Liganden $[L]$, y-Achse: Konzentration des Rezeptor-Ligand-Komplexes $[RL]$, [Motulsky, 1995]

Die Kurve lässt sich durch folgende Gleichung beschreiben:

$$[RL] = B_{\max} \cdot [L] / K_D + [L]$$

Legt man diese Gleichung einer computergestützten nichtlinearen Regressionsanalyse zugrunde, erhält man aus den Daten des Sättigungsexperiments den K_D - und B_{\max} -Wert. [Motulsky, 1995; Deupree, Bylund, 2002]

Um nach dieser Methode sinnvolle Ergebnisse zu erhalten, müssen folgende Voraussetzungen erfüllt sein:

- Für die Bindung des Liganden an den Rezeptor muss das Massenwirkungsgesetz gelten und das System muss sich im Gleichgewicht befinden.
- Es muss eine einheitliche Rezeptorpopulation vorliegen.
- Es darf nur ein kleiner Teil des zugesetzten Radioliganden gebunden werden (maximal 10%), so dass die Konzentration des ungebundenen Liganden mit der eingesetzten Radioligandenkonzentration gleichgesetzt werden kann.
- Die Rezeptorkonzentration (B_{\max}) sollte nicht mehr als 10% des K_D -Wertes betragen, da sich sonst die Gefahr einer Unterschätzung der Affinität erhöht.
- Es darf keine Kooperativität vorliegen, d.h. die Bindung eines Liganden darf die Affinität der Bindungsstellen für diesen Liganden nicht verändern (der K_D -Wert des Liganden muss während des Experiments gleich bleiben). [Motulsky, 1995]

Eine Alternative zur Bestimmung von K_D - und B_{\max} -Wert über nichtlineare Regressionsanalyse der Sättigungsisotherme ist die bereits durch Decker, Höfgen und Wittig aus dem Arbeitskreis [Decker, 2001; Hoefgen, 2002; Wittig, 2004] beschriebene Bestimmung über eine Zwei-Punkte-Methode. Man arbeitet dabei mit einer „verkürzten“, nur aus zwei Punkten bestehenden Sättigungsisotherme, indem die spezifische Bindung $[RL]$ nur bei einer geringen und einer hohen Radioligandenkonzentration ($[L]_1$ und $[L]_2$) bestimmt wird. Die

Gleichung der Sättigungsisotherme nimmt dann für die beiden Ligandenkonzentrationen folgende Form an:

$$[RL]_1 = (B_{\max} \cdot [L]_1 / K_D) / (1 + [L]_1 / K_D)$$

$$[RL]_2 = (B_{\max} \cdot [L]_2 / K_D) / (1 + [L]_2 / K_D)$$

Durch Auflösen beider Gleichungen nach $1/K_D$, Gleichstellen und Umformen nach B_{\max} ergibt sich folgende Formel zur Berechnung der Rezeptordichte:

$$B_{\max} = ([RL]_1 \cdot [RL]_2 \cdot ([L]_2 - [L]_1)) / ([L]_2 \cdot [RL]_1 - [L]_1 \cdot [RL]_2)$$

Der errechnete B_{\max} -Wert kann in die oben beschriebene Gleichung der verkürzten Sättigungsisotherme eingesetzt, und nach Umformen in die folgende Formel der K_D -Wert nach Lazareno und Birdsall [Lazareno, Birdsall, 1995] berechnet werden.

$$K_D = ([L] \cdot (B_{\max} - [RL])) / [RL]$$

Die auf diese Weise erhaltenen K_D -Werte der entsprechenden Radioligand-Rezeptor-Systeme können zur Bestimmung von Inhibitionskonstanten (K_i -Werte) nicht radioaktiv markierter Testsubstanzen mit Hilfe von Konkurrenzexperimenten verwendet werden [Motulsky, 1995; Deupree, Bylund, 2002].

C.2.1.3 Kompetitive Bindungsexperimente

Die Affinität eines unmarkierten Liganden kann indirekt über seine Fähigkeit, mit einem Radioliganden um die Bindungsstelle zu konkurrieren und den Radioliganden zu verdrängen, bestimmt werden (heterologes Konkurrenzexperiment). Verschiedene Konzentrationen des kalten Liganden werden mit einer konstanten Radioliganden- und Rezeptorkonzentration inkubiert und nach Abtrennung der ungebundenen Radioligandenmenge die gebundene Radioaktivität gemessen. Der unmarkierte Ligand wird auch als Inhibitor oder Konkurrent bezeichnet. Trägt man die logarithmierte Konzentration des kalten Liganden gegen die gebundene Radioaktivität auf, so erhält man eine sigmoidale Kurve (siehe Abbildung C-3). Mit steigender Konzentration an unmarkiertem Liganden nimmt die gebundene Radioaktivität ab. Das obere Plateau der Kurve entspricht der Radioligandenbindung in Abwesenheit eines konkurrierenden Liganden (Total), das untere Plateau stellt die unspezifische Bindung (NS) dar. Die Differenz zwischen oberem und unterem Plateau ist die spezifische Bindung. Der Wendepunkt der Kurve entspricht der Konzentration des unmarkierten Liganden, welche in der Lage ist, die spezifische Bindung des Radioliganden um 50% zu reduzieren. Diese Konzentration wird als IC_{50} -Wert (halbmaximale inhibitorische Konzentration) des kalten Liganden bezeichnet.

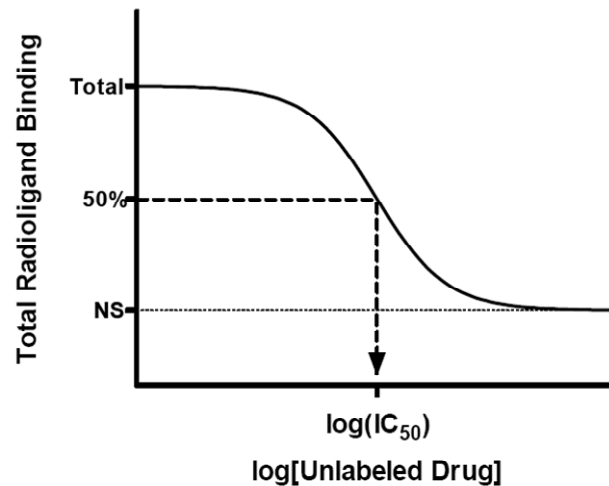


Abbildung C-3 Inhibitionskurve, Total = Radioligandenbindung in Abwesenheit eines konkurrierenden Liganden (Gesamtbindung), NS = Unspezifische Bindung (nonspecific binding), IC_{50} = halbmaximale inhibitorische Konzentration [Motulsky, Christopoulos, 2003]

Wenn der Radioligand und die unmarkierte Testsubstanz um eine einheitliche Population voneinander unabhängiger Bindungsstellen konkurrieren, so ist die Form der Inhibitionskurve durch das Massenwirkungsgesetz bestimmt (Abbildung C-4). Um die spezifische Radioligandenbindung auf 10% zu senken, braucht man in diesem Fall eine 81-mal höhere Inhibitorkonzentration als zur Absenkung der spezifischen Bindung auf 90% nötig sind. Oder anders ausgedrückt, der Anstieg der Kurve von 0% auf 100% spezifische Bindung erstreckt sich über zwei Zehnerpotenzen auf der logarithmischen Konzentrations-Achse.

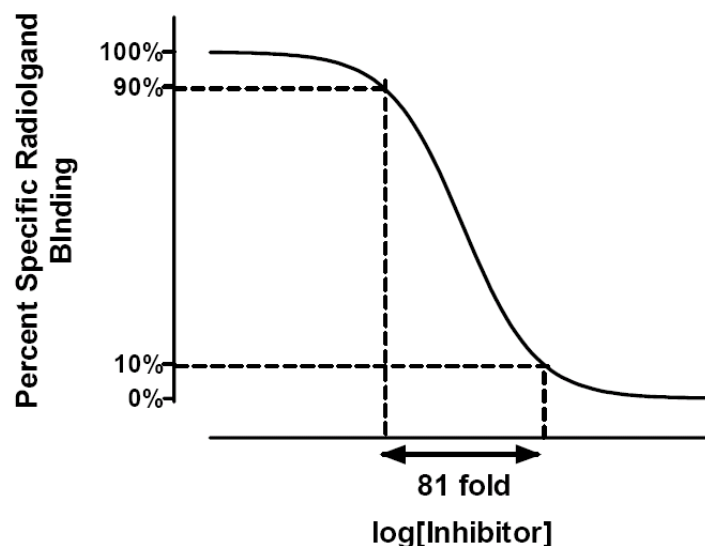


Abbildung C-4 Form einer Inhibitionskurve, die dem Massenwirkungsgesetz gehorcht [Motulsky, Christopoulos, 2003]

Die Steigung der Kurve kann über den Hill-Koeffizienten (Hill slope) n_H quantifiziert werden. Eine Standard-Inhibitionskurve, die dem Massenwirkungsgesetz gehorcht, hat einen Hill slope von $n_H = -1,0$. Je steiler der Anstieg ist, umso negativer wird der Hill-Koeffizient,

während der Wert bei flacheren Kurven größer wird (siehe Abbildung C-5). Weicht der Hill-Koeffizient stark von $n_H = -1,0$ ab, kann man nicht von einem dem Massenwirkungsgesetz folgenden Bindungsmechanismus an einer einheitlichen Rezeptorpopulation ausgehen.

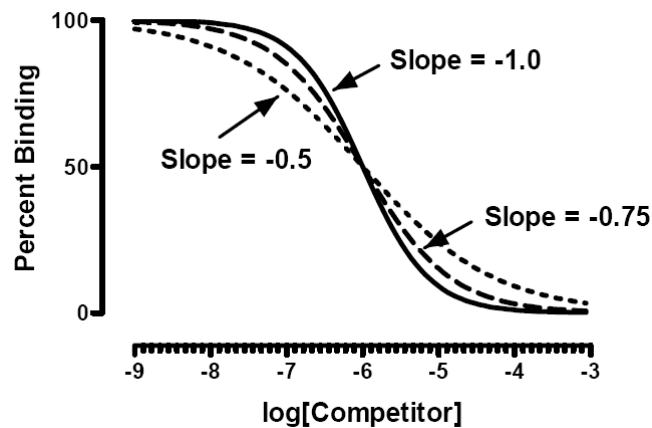


Abbildung C-5 Inhibitionskurven mit unterschiedlicher Steigung, $Slope = n_H$ (Hill-Koeffizient) [Motulsky, Christopoulos, 2003]

Ein flacherer Kurvenverlauf kann auf eine negative Kooperativität (Bindung eines unmarkierten Liganden an eine Bindungsstelle kann die Affinität der verbleibenden Bindungsstellen für den betreffenden Liganden herabsetzen) oder das Vorliegen einer heterogenen Rezeptorpopulation (nicht alle Rezeptoren binden den Liganden mit der gleichen Affinität) hindeuten. Umgekehrt kann bei einer steileren Kurve eine positive Kooperativität vorliegen. Steilere Kurven können auch resultieren, wenn die Inkubationszeit nicht zur Gleichgewichtseinstellung ausreichte.

Die Affinität eines Inhibitors zum Rezeptor wird durch die Gleichgewichtskonstante K_i (Inhibitionskonstante) in mol/l ausgedrückt. Für Inhibitionskurven mit einem Anstieg von $n_H = 1$ lässt sich der K_i -Wert nach der Gleichung von Cheng und Prusoff [Cheng, Prusoff, 1973] aus dem IC_{50} -Wert des kalten Liganden, der Radioligandenkonzentration $[L]$ und der Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D des Radioliganden berechnen.

$$K_i = IC_{50} / (1 + [L]/K_D)$$

Den IC_{50} -Wert erhält man durch nichtlineare Regressionsanalyse der Inhibitionskurve, die Radioligandenkonzentration $[L]$ ist bekannt und der K_D -Wert wird unter den gleichen experimentellen Bedingungen durch Sättigungsexperimente bestimmt. Der K_i -Wert des unmarkierten Liganden ist eine Konstante für die Affinität des Liganden zu einem bestimmten Rezeptor, während der IC_{50} -Wert von der Konzentration und der Art des verwendeten Radioliganden beeinflusst wird [Motulsky, 1995; Deupree, Bylund, 2002]. Weicht der Hill-Koeffizient erheblich von $n_H = -1,0$ ab, ist es nicht sinnvoll aus der halbmaximalen inhibitorischen Konzentration IC_{50} einen K_i -Wert zu berechnen, da es unter diesen Bedingungen schwierig ist, die Bedeutung des IC_{50} -Wertes zu interpretieren. Man gibt in

solchen Fällen den IC_{50} -Wert als empirische Größe für die inhibitorische Potenz des Liganden an [Motulsky, Christopoulos, 2003]. Für die Anwendbarkeit der Gleichung nach Cheng und Prusoff gelten die gleichen Bedingungen wie unter C.2.1.2 für die Anwendung der Sättigungsisotherme beschrieben.

Auf diesem Wege besteht die Möglichkeit, die Affinitäten einer großen Zahl von Verbindungen zu verschiedenen Rezeptoren relativ schnell zu bestimmen.

C.2.2 Durchführung der Inhibitionsexperimente

C.2.2.1 Herstellung einer Ganzzeilsuspension

Bei der Durchführung von Radioligandbindungsexperimenten hat man die Möglichkeit, mit Ganzzeilsuspensionen (intact cell radioligand binding assay) oder Membranpräparationen (membrane filtration receptor assay) zu arbeiten. Bei früheren Radioligandbindungsexperimenten des Arbeitskreises wurde festgestellt, dass Ganzzeilsuspensionen bessere Ergebnisse liefern, da bei Experimenten mit Membranpräparationen die unspezifische Bindung sehr hoch ausfallen konnte (>50%) und deren Wert nicht immer reproduzierbar war [Decker, 2001]. Deshalb wurde für alle Experimente eine Ganzzeilsuspension verwendet. Die Zeilsuspension musste unmittelbar vor jedem geplanten Versuch hergestellt werden. Das Vorbereiten einer größeren Menge an Ganzzeilsuspension und deren Lagerung im eingefrorenen Zustand war nicht möglich, da die spezifischen Bindungsstellen dabei zerstört werden.

Analog der in Kapitel C.1.2 beschriebenen Vorgehensweise wurde ein Zellpellet gewonnen, welches nach Absaugen des Trypsin/EDTA Überstandes in 20ml kaltem PBS Puffer (siehe Kapitel C.2.4.1) resuspendiert und erneut, wie in Kapitel C.1.3 beschrieben, zentrifugiert wurde. Dieser Waschvorgang wurde nochmals mit 20ml PBS Puffer wiederholt und das Medium freie Zellpellet in 12ml kaltem Messpuffer (siehe Kapitel C.2.4.1) aufgenommen. Diese Suspension wurde anschließend für ein Bindungsexperiment verwendet. Direkt vor der Verwendung wurde die Suspension auf einem Minischüttler (Ika Labortechnik, Staufen) gut homogenisiert und unverzüglich in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte (PP-Masterblock, 96well, 1ml, U-Boden, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) pipettiert, um eine möglichst homogene Verteilung der Zellen in den Wells zu erreichen. Bei Experimenten mit HEK Zelllinien wurden pro Experiment zwei Drittel einer 90% konfluenten T175 Gewebekulturfasche zur Herstellung der Ganzzeilsuspension verwendet. Das restliche Drittel wurde zur Weiterkultivierung in eine Kulturfasche mit frischem Medium überführt. Für Ganzzeilsuspensionen aus CHO Zellen wurden pro Experiment zwei bewachsene T175 Kulturfaschen benutzt und eine dritte Flasche zur Vermehrung auf drei frische Gewebekulturfaschen verteilt.

C.2.2.2 Screening und K_i -Wert Bestimmung

Um das Ausmaß der Affinität einer Testsubstanz abschätzen zu können, wurde ein so genanntes Grobscreening oder Schnellscreening durchgeführt. Hierzu wurde neben der Gesamtbinding und der unspezifischen Binding die Inhibition der Radioligandenbinding bei nur einer Konzentration der Testsubstanz bestimmt. Die Testsubstanz wurde dabei in einer Endkonzentration von $10\mu\text{M}$ eingesetzt. Zur Bestimmung der Gesamtbinding wurde dem Versuchsansatz statt der Lösung einer Testsubstanz das gleiche Volumen Messpuffer zugesetzt. Die unspezifische Binding wurde in Anwesenheit eines alle spezifischen Rezeptorbindungsstellen blockierenden Inhibitors bestimmt. Dazu wurde für die Rezeptoren der D_1 Familie und den 5-HT_{2A} Rezeptor Fluphenazin in einer Endkonzentration von $10\mu\text{M}$ verwendet. Bei Experimenten mit der D_2 Rezeptorfamilie wurde mit Haloperidol in einer Endkonzentration von $1\mu\text{M}$ gearbeitet.

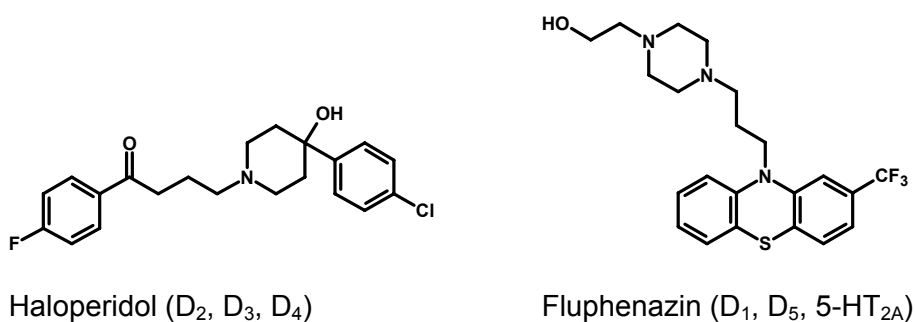


Abbildung C-6 Inhibitoren zur Bestimmung der unspezifischen Binding

Für jede Testsubstanz wurde so die prozentuale Abnahme der rezeptorgebundenen Radioaktivität in Anwesenheit der Substanz bestimmt. Lag diese über 60%, wurde der K_i -Wert der Substanz bestimmt. Zur Bestimmung des K_i -Wertes wurden mindestens sieben verschiedene Konzentrationen der Testsubstanz vermessen. Standardmäßig wurden folgende Endkonzentrationen benutzt: $100\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$, $1\mu\text{M}$, 100nM , 10nM , 1nM und 100pM . Bei höheraffinen Substanzen ($K_i < 100\text{nM}$) wurde mit noch weiter verdünnten Lösungen gearbeitet. Die Verdünnungsreihe sollte sich jeweils über drei Zehnerpotenzen ober- und unterhalb des K_i -Wertes erstrecken. In einem Experiment wurde jede Konzentration der Testsubstanzen 3-fach vermessen. Auch unspezifische und Gesamtbinding wurden aus mindestens drei Wells bestimmt. So konnten pro Experiment im 96well Format maximal 30 Substanzen im Grobscreening oder vier Verbindungen zur K_i -Wert Bestimmung untersucht werden. Die Versuchsansätze hatten ein Volumen von $550\mu\text{l}$ und setzten sich wie folgt zusammen:

Volumen [μ l]	Bestandteil
345	Messpuffer
55	Verdünnung der Testsubstanz oder Messpuffer zur Bestimmung der Gesamtbindung oder Lösung des Inhibitors zur Bestimmung der unspezifischen Bindung
100	Ganzzeilsuspension
50	Lösung des Radioliganden

Tabelle C-2 Zusammensetzung eines Versuchsansatzes

Die Bestandteile wurden in der in Tabelle C-2 angegebenen Reihenfolge in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert. Um die unspezifische Bindung des Radioliganden zur Oberfläche des Ansatzgefäßes zu minimieren, wurde der Radioligand als letzte Komponente zum Ansatz gegeben. Die früher im Arbeitskreis durchgeführte Maßnahme, die Reaktionsgefäße vor der Verwendung zu silanisieren [Wittig, 2004], um die unspezifische Bindung zur Gefäßoberfläche herabzusetzen, erwies sich als unnötig, da auch ohne diesen Arbeitsschritt zufriedenstellende Ergebnisse erzielt wurden. Die fertig pipettierte Platte wurde mit Parafilm abgedeckt und unter Schütteln für 90 Minuten bei 27°C inkubiert. Die Inkubationszeit sollte ausreichend lang sein, dass das System ein stabiles Fließgleichgewicht erreicht, da den Experimenten ein Gleichgewichtsmodell zugrunde liegt. Laut Bylund [Bylund, Toews, 1993] erreichen die meisten Radioliganden in einer Konzentration um ihren K_D -Wert, bei Raumtemperatur nach 20 bis 60 Minuten ein Steady State (Fließgleichgewicht). Nach Einstellung des Gleichgewichts sollte noch 30 Minuten inkubiert werden. Es ist weit verbreitet, die Bindungsexperimente bei Raumtemperatur durchzuführen, einige Forscher arbeiten mit einer physiologischen Temperatur von 37°C, andere wiederum sind der Meinung bei 4°C würde man die am besten reproduzierbaren Ergebnisse erhalten [Bylund, Toews, 1993]. Für diese Arbeit wurde eine Inkubationszeit von 90 Minuten und eine Temperatur von 27°C gewählt, um die Daten mit anderen im Arbeitskreis nach dieser Methode gewonnenen Ergebnissen vergleichen zu können. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der freie Radioligand vom gebundenen Radioliganden durch Vakuumfiltration über einen Glasfaserfiltermatte unter Verwendung eines Filtrierautomaten (Harvester siehe Abschnitt C.2.4.3) abgetrennt. Dabei wurde ein gespeichertes Programm von Filtrations-, Spül- und Waschzyklen durchlaufen, welches eine schnelle und optimale Trennung der Rezeptor-Ligand-Komplexe von der Inkubationslösung und ein intensives Auswaschen der Wells und des Filters ermöglichte, ohne dass es zu einer nennenswerten Dissoziation der Rezeptor-Ligand-Komplexe, die bei diesem Arbeitsschritt eine Gefahr darstellt, kam. Um die

unspezifische Bindung zum Filtermaterial zu minimieren, wurde die Filtermatte vor dem Filtrationsvorgang für 90 Minuten in eine wässrige Polyethyleniminlösung eingelegt. Nach dem Einlegen der Filtermatte in das Gerät bestand der erste Schritt darin, den Filter mit Aqua purificata zu spülen, um überschüssiges Polyethylenimin zu entfernen. Anschließend wurde die bis zu diesem Zeitpunkt geschüttelte Mikrotiterplatte zügig in das Gerät eingespannt und aus allen Wells die Zellen mit den Rezeptor-Ligand-Komplexen abfiltriert. Darauf folgten vier Waschzyklen. Die einzelnen Vorgänge dauerten zwischen einer und sieben Sekunden. Als Waschflüssigkeit diente kaltes gereinigtes Wasser. Danach wurde die Filtermatte in einem Mikrowellengerät getrocknet und in eine Zählkassette eingelegt. Jedes Zählfeld wurde mit einem Tropfen Szintillationsflüssigkeit, welche die ausgesendete β -Strahlung des Tritiums in messbares Fluoreszenzlicht umwandelt, benetzt und die gebundene Radioaktivität mit einem Szintillationszähler bestimmt.

Parallel zu den Inhibitionsexperimenten wurden zwei Kontrollwerte zur Bestimmung der Radioligandenkonzentration gemessen, deren Mittelwert für die Auswertung der Experimente benutzt wurde. Dazu wurde die gleiche Menge der Radioligandenlösung wie sie auch in den Versuchsansätzen benutzt wurde (50 μ l wässrige Lösung), in je einem Szintillationsgefäß mit 5ml wasseraufnehmender Szintillationsflüssigkeit versetzt und in einem Flüssigszintillationszähler die Radioaktivität bestimmt. Die Zähldauer pro Well und pro Probengefäß betrug drei Minuten.

C.2.2.3 Auswertung der Messergebnisse

Die Daten der als Dreifachbestimmung durchgeführten Bindungsexperimente wurden mit der Software GraphPad Prism®, Version 4.0 (GraphPad Software Inc., San Diego CA, USA) ausgewertet. Vor der Eingabe der Einzeldaten in das Programm wurden die vom Counter gemessenen cpm-Werte (counts per minute) durch Multiplikation mit 3 (bezieht die Zählleistung des Counters ein) in dpm (disintegrations per minute) umgerechnet. Nach Einfügen der Rohdaten in die Software GraphPad Prism® wurden die Mittelwerte der Datensätze gebildet, die Werte in halblogarithmischer Form (logarithmierte Konzentration des Inhibitors auf der x-Achse, dpm auf der y-Achse) dargestellt und mit Hilfe nichtlinearer Regression unter Anwendung einer 3-Parameter Gleichung für kompetitive Bindung an einer einheitlichen Rezeptorpopulation (Funktion „one-site competition“) analysiert. Diese Funktion legt eine Bindungskurve mit einem Anstieg von $n_H = -1,0$ durch die Datenpunkte und berechnet IC_{50} - und K_i -Wert. Um die Berechnung des K_i -Wertes zu ermöglichen, wurden jeweils der K_D -Wert des Radioligand-Rezeptor-Systems und die bei jedem Experiment bestimmt Radioligandenkonzentration $[L]$ eingegeben. Die Funktion „one-site competition“ ist identisch zur Funktion „sigmoidal-dose response“ mit einem Hill-Koeffizienten von $n_H = -1,0$. Zur Überprüfung der Kurvensteigung wurden die Daten mit der Funktion „sigmoidal-dose

response (variable slope)“, welcher eine 4-Parameter Gleichung nach Hill zugrunde liegt analysiert und damit der Hill-Koeffizient bestimmt.

Die Radioligandenkonzentration [L] in nmol/l wurde nach folgender Formel berechnet:

$$[L] = \text{K-Wert} / (2220 \cdot V \cdot A_{\text{spez}})$$

K-Wert	Kontroll-Wert [dpm]
V	Volumen des Versuchsansatzes [ml]
A _{spez}	spezifische Aktivität des Radioliganden [Ci/mmol]
2220	Faktor zur Umrechnung der Einheiten

Zur Ermittlung des Kontroll-Wertes (K-Wert) wurde die Zählrate der auch im Experiment verwendeten Radioligandenmenge nach Zugaben von Szintillationsflüssigkeit bestimmt.

Die im Ergebnisteil angegebenen K_i-Werte sind Mittelwerte aus mindestens zwei Experimenten, die mit voneinander unabhängigen Verdünnungsreihen durchgeführt wurden. Für alle Berechnungen außerhalb der nichtlinearen Regressionsanalyse wurde die Software Microsoft® Excel genutzt.

C.2.3 Etablierung des Radioligandbindungsassays an 5-HT_{2A} Rezeptor exprimierenden Zelllinien und an neuen Dopamin D₂ und D₃ Zelllinien

Die bereits in Abschnitt C.1.1 erwähnten HEK 5-HT_{2A}, HEK D₂ und HEK D₃ Zelllinien waren bis dato im Arbeitskreis nicht etabliert. Um mit den neu erhaltenen Zelllinien Inhibitionsexperimente durchführen zu können, mussten diese in Sättigungsexperimenten zur Bestimmung der Rezeptordichte (B_{max}) und der Affinität des gewählten Radioliganden (K_D) (siehe Abschnitt C.2.1.2) charakterisiert werden. Um die Rezeptordichte in der allgemein gebräuchlichen Einheit fmol/mg Protein angeben zu können, war der Proteingehalt der verwendeten Zellsuspension zu ermitteln.

C.2.3.1 Proteinbestimmung

Der Proteingehalt der verwendeten Ganzzellsuspensionen wurde nach der von Bradford [Bradford, 1976] beschriebenen Methode unter Verwendung von Coomassie Brilliantblau G250 bestimmt. Das Absorptionsmaximum einer sauren Lösung des Farbstoffs verschiebt sich in Gegenwart von Proteinen von 465nm auf 595nm. Die Zunahme der Absorption des Farbstoffes bei 595nm ist ein Maß für die Proteinmenge in der Probe. Der Vorteil dieser Methode ist ihre Unempfindlichkeit gegenüber störenden Ionen und Reduktionsmitteln. Laut Compton [Compton, Jones, 1985] bindet der Farbstoff hauptsächlich an basische und aromatische Aminosäurereste, vor allem an Arginin. Man nimmt an, dass durch die Bindung zwischen Protein und Farbstoff die anionische, unprotonierte Form des Säurefarbstoffs stabilisiert wird [Lottspeich, Zorbas, 1998].

Die Reste der Zellsuspensionen der Sättigungsexperimente zur K_D-Wert Bestimmung wurden bis zur Proteinbestimmung bei -20°C gelagert. Am Versuchstag wurden die Zellsuspensionen aufgetaut und gründlich homogenisiert. Als Standards zur Erstellung einer

Kalibriergerade wurden BSA-Lösungen (bovines Serumalbumin) in Messpuffer (C.2.4.1), die Endkonzentrationen zwischen 2,5 und 25 µg/ml ergaben, verwendet. Die Versuchsansätze mit einem Gesamtvolumen von 1ml setzten sich wie folgt zusammen und wurden jeweils im Triplikat hergestellt:

Menge [µl]	Bestandteil
100	Messpuffer zur Blindwertbestimmung, Zellsuspension oder BSA-Lösung als Standard
20	0,1N NaOH
20	0,1N HCl
860	Aqua bidest

Tabelle C-3 Zusammensetzung des Versuchsansatzes zur Proteinbestimmung

Die Bestandteile wurden in der angegebenen Reihenfolge zugesetzt. Nach Zugabe der Natronlauge wurden die Ansätze mittels Rotationsschüttler und Ultraschallbad homogenisiert, 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend nochmals homogenisiert. Das Alkalisieren sollte zu einer vollständigen Zelllyse führen. Die lysierten Proben wurden mit Salzsäure neutralisiert, mit Wasser verdünnt und erneut gründlich gemischt. 500 µl jedes Ansatzes wurden in einer Polystyrol-Küvette mit je 500 µl Bradford-Reagenz gemischt und nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur die Absorption bei 595nm gemessen. Das Bradford-Reagenz wurde am Versuchstag frisch nach folgender Vorschrift hergestellt: 10mg Coomassie Brilliantblau G250 in 5ml Ethanol 95%(v/v) und 10ml o-Phosphorsäure 85% (v/v) lösen, mit Aqua bidest auf 100ml auffüllen und filtrieren. Aus den ermittelten Absorptionen wurde unter Berücksichtigung aller Verdünnungsschritte der Proteingehalt der Zellsuspension bestimmt.

C.2.3.2 Bestimmung der K_D -Werte

Die Charakterisierung der HEK 5-HT_{2A}, HEK D₂ und HEK D₃ Zelllinien erfolgte mit der bereits unter C.2.1.2 beschriebenen Zwei-Punkte-Methode, bei der die unspezifische und die Gesamtbindung jeweils bei einer hohen und einer niedrigen Radioligandenkonzentration bestimmt werden. Jeder Bindungsversuch wurde mindestens als Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Experimente wurden unter den in Abschnitt C.2.2 beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Für die Charakterisierung der HEK 5-HT_{2A} Zellen wurde der Radioligand in Endkonzentrationen von ~3 und 0,3nmol/l eingesetzt, während bei den

HEK D₂ und HEK D₃ Zellen mit Konzentrationen von ~1 und 0,2nmol/l gearbeitet wurde. Als Inhibitor zur Bestimmung der unspezifischen Bindung wurde für die HEK D₂ und D₃ Zellen Haloperidol in einer Endkonzentration von 1µmol/l verwendet, da dieser Ligand sich bereits bei den Experimenten mit CHO D₂ und D₃ Zelllinien als geeignet erwiesen hatte. Die unspezifische Bindung des Radioliganden an HEK 5-HT_{2A} Zellen wurde, um einen geeigneten Inhibitor zu finden, zunächst jeweils in Anwesenheit von Haloperidol [1µM] und Fluphenazin [10µM] untersucht. Dabei konnten mit Fluphenazin in 10µM Endkonzentration zufrieden stellende Ergebnisse erzielt werden. Bei allen drei zu charakterisierenden Zelllinien wurde mit dem Radioliganden [³H]Spiperon (siehe Abschnitt C.2.4.2) gearbeitet. Die passenden Radioligandenkonzentrationen wurden aus Experimenten mit verschiedenen hohen und niedrigen Konzentrationen ermittelt. Bei den niedrigen Konzentrationen wurde diejenige gewählt, mit der eine ausreichend hohe Gesamtbindung (die vom Messgerät mit genügender Genauigkeit erfasst werden kann) bei gleichzeitig minimaler unspezifischer Bindung erzielt werden konnte. Die spezifische Bindung sollte einen möglichst hohen Anteil an der Gesamtbindung haben (siehe auch Abschnitt C.2.1.2). Im oberen Konzentrationsbereich wurde die eingesetzte Radioligandenmenge solange gesteigert, bis das Plateau der Sättigungs-kurve gerade erreicht wurde, .d.h. bis sich mit einer Erhöhung der Radioligandenkonzentration die Gesamtbindung nur noch unwesentlich steigerte, während die unspezifische Bindung weiter zunahm. Die Konzentration, welche die maximale Gesamtbindung mit der gleichzeitig niedrigsten unspezifischen Bindung erreichte, wurde für die weiteren Experimente verwendet.

C.2.4 Materialien

C.2.4.1 Reagenzien und Puffer

Als Messpuffer wurde ein in der Literatur [Mierau et al., 1995] beschriebener TRIS-Puffer verwendet, der auch schon bei vorhergehenden Experimenten im Arbeitskreis [Decker, 2001; Wittig, 2004; Mohr, 2005] zum Einsatz kam.

Zusammensetzung des Messpuffers:

TRIS-HCl (Tris(hydroxymethyl)aminomethan-hydrochlorid) 50mM (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen), Magnesiumchlorid 5mM (VWR international GmbH, Dresden) wurden in Aqua purificata gelöst und der pH-Wert der Lösung mit 0,1N HCl auf pH 7,4 gebracht.

Ein PBS Puffer (phosphate buffered saline) wurde als isotoner Waschpuffer verwendet.

Zusammensetzung des Waschpuffers:

Natriumchlorid 137mM, Kaliumchlorid 2,7mM, Dinatriumhydrogenphosphat 8,1mM, Kaliumdihydrogenphosphat 1,4mM (alle VWR international GmbH, Dresden) wurden in Aqua purificata gelöst und die Lösung mit 0,1N HCl auf pH 7,4 eingestellt.

Die Testsubstanzen wurden auf 0,1mg genau eingewogen (Präzisionswaage, Denver Instrument GmbH, Göttingen) und zur Herstellung einer 10mM Stammlösung in Dimethylsulfoxid gelöst. Die Stammlösungen wurden bei -20°C gelagert. Aus der Stammlösung wurden vor jedem Experiment Verdünnungen der Testsubstanzen in Messpuffer hergestellt.

Für die Inhibitorlösungen zur Bestimmung der unspezifischen Bindung wurden die Hydrochloride von Fluphenazin und Haloperidol in Aqua purificata zu 100 bzw. 10µM gelöst und diese Lösungen im Kühlschrank vorrätig gehalten.

Die Filtermatten wurden vor der Verwendung für 90 Minuten in eine 2-prozentige wässrige Polyethyleniminlösung (PEI-Lösung 50% (v/v) in H₂O, Fluka Chemie GmbH, Deisenhofen) eingelegt, um die unspezifische Bindung des Radioliganden an den Glasfaserfiltern zu minimieren.

C.2.4.2 Radioliganden

Es steht eine große Auswahl an kommerziell erhältlichen Radioliganden zur Verfügung, die mit verschiedenen Radioisotopen markiert sind. Die gängigsten Radioisotope sind Tritium (³H) und Iod (¹²⁵I). Bei der Wahl des Radioliganden muss zusätzlich zum Radioisotop auch die Selektivität und Affinität des Radioliganden zum Rezeptor, das Ausmaß der unspezifischen Bindung und die Funktionalität (agonistische oder antagonistische Aktivität) des Liganden am Rezeptor berücksichtigt werden.

Ein Vorteil von Tritium gegenüber Iod ist dessen lange Halbwertszeit (Tritium 12,3 Jahre, Iod 60 Tage), so dass diese Radioliganden länger gelagert werden können. Unter dem Aspekt der Entsorgung betrachtet, kann dies aber auch als Nachteil gewertet werden. Tritium hat, verglichen mit Iod, eine relativ geringe spezifischen Aktivität (30-100Ci/mmol gegenüber >2200Ci/mmol bei ¹²⁵I), es kann daher nur bei ausreichend hoher Rezeptordichte verwendet werden. Im Allgemeinen gilt, je höher die Affinität des Radioliganden zum Rezeptor, mit desto kleineren Radioligandenkonzentrationen kann gearbeitet werden und damit ist auch die unspezifische Bindung geringer. Zudem ist die Dissoziationsgeschwindigkeit des Rezeptor-Ligand-Komplexes umso geringer, je höher die Affinität des Liganden zum Rezeptor ist. Für die Experimente wurden zwei Tritium markierte Radioliganden verwendet, die bereits durch frühere Arbeiten [Decker, 2001; Wittig, 2004] im Arbeitskreis für Gleichgewichtsexperimente an Dopaminrezeptoren etabliert waren. Es handelt sich um Verbindungen mit antagonistischer Aktivität. Für Affinitätsbestimmungen zu Rezeptoren der D₁ Familie (D₁ und D₅) wurde die von der Firma Schering entwickelte Substanz SCH23390 mit einer Tritium markierten N-Methylgruppe ([³H]SCH23390, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) verwendet. Die spezifische Aktivität betrug je nach Charge 70-90Ci/mmol. Tritium

markiertes Spiperon ($[^3\text{H}]$ Spiperon, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK und Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig) wurde für die Versuche an Rezeptorsubtypen der D_2 Familie (D_2 , D_3 , D_4) und auch für die Experimente an 5-HT_{2A} Rezeptoren benutzt. Die spezifische Aktivität betrug bei dem von GE Healthcare gelieferten Produkt je nach Charge zwischen 95-120Ci/mmol. Das $[^3\text{H}]$ Spiperon der Firma Hartmann hatte eine spezifische Aktivität von 25Ci/mmol. Die vom Lieferanten bezogenen Stammlösungen wurden in gereinigtem Wasser verdünnt und für die Inhibitionsexperimente in Endkonzentrationen zwischen 0,15 und 0,35nM eingesetzt (zur Bestimmung der geeigneten Radioligandenkonzentration siehe Abschnitt C.2.3.2).

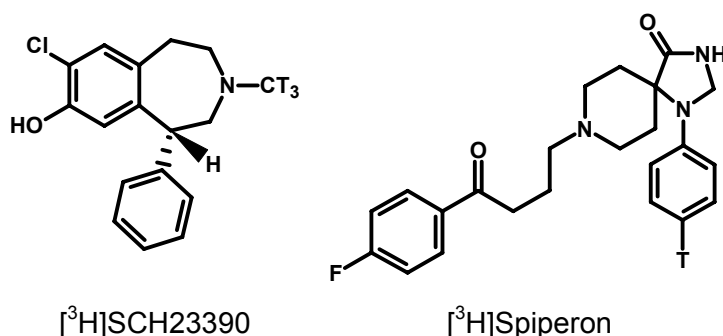


Abbildung C-7 Strukturen der verwendeten Radioliganden

Rezeptor	SCH23390		Spiperon	
	K_i [nM]	Referenz	K_i [nM]	Referenz
5-HT_{2A}	13,2	[Porter et al., 1999]	0,30	[Roth et al., 1995]
D_1	0,35	[Sunahara et al., 1991]	220	[Sunahara et al., 1991]
D_5	0,30	[Sunahara et al., 1991]	4500	[Sunahara et al., 1991]
D_2	913	[Van Tol et al., 1991]	0,06	[Seeman, Van Tol, 1995]
D_3	>10000	[Van Tol et al., 1991]	0,28	[Cussac et al., 2000]
D_4	3560	[Van Tol et al., 1991]	0,31	[Seeman, Van Tol, 1995]

Tabelle C-4 Affinitäten der als Radioliganden verwendeten Substanzen, die Affinitäten zu den Rezeptoren für die der Radioligand zur Anwendung kam sind fett gedruckt

Antagonisten sind für Gleichgewichtsexperimente zu bevorzugen, da Agonisten die Zellen und Rezeptoren während der Inkubation verändern können (z.B. die Rezeptordichte). Auch wenn der konkurrierende kalte Ligand ein Agonist ist, kann dies zu Komplikationen führen, da Agonisten großen Einfluss auf die Rezeptoreigenschaften haben können. Die Bindung eines Agonisten an einen Rezeptor auf der Zelloberfläche aktiviert nicht nur den Rezeptor,

sondern kann eine Reihe adaptiver Veränderungen in Gang setzen. Oft werden durch diese Veränderungen rezeptorvermittelte Effekte verringert (Rezeptordesensibilisierung). Ursachen dafür können kovalente Modifikationen des Rezeptors (z.B. Phosphorylierung), Änderungen in der Rezeptor-Effektor-Interaktion (Entkopplung) oder der subzellulären Verteilung der Rezeptoren (Rezeptorinternalisierung und –sequestration), sowie Abweichungen in der Rezeptorzahl (Down-Regulation) sein. Verglichen mit der Zeit, die bis zur Einstellung eines Fließgleichgewichts im Reaktionsansatz benötigt wird, laufen diese Umgestaltungen in relativ kurzer Zeit ab [Bylund, Toews, 1993].

C.2.4.3 Sonstige Materialien und Geräte

Stammlösungen und Verdünnungen der Testsubstanzen wurden in 1,5ml PP-Reaktionsgefäßen (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) hergestellt. Für die Versuchsansätze wurden 96er deep-well Mikrotiterplatten (PP-Masterblock, 96well, 1ml, U-Boden, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) verwendet, die zur Inkubation mit Parafilm (American National Can, Chicago, IL, USA) abgedeckt wurden. Inkubiert wurde in einem beheizbaren Schüttler (Thermocycler comfort, Eppendorf, Wesseling). Die Abtrennung des ungebundenen Radioliganden erfolgte mittels eines Harvesters 96® (Mach III, Tomtec, Hamden, CT, USA) über Glasfaserfiltermatten (Filtermat A, PerkinElmer, Groningen, NL). Nach der Trocknung im Mikrowellengerät (MW21, Clatronic, Kempen) wurden die Filtermatten in eine Zählkassette eingelegt (Omnifilter Kit, PerkinElmer, Groningen, NL) und nach dem Befeuchten mit Szintillationsflüssigkeit (Microscint-20, PerkinElmer, Groningen, NL) mit einer Verschlussfolie (adhäsive PCR Verschlussfolie, VWR international GmbH, Dresden) abgedeckt. Die Messung der gebundenen Radioaktivität erfolgte mit einem Top Count NXT® Microplate Scintillation Counter (PerkinElmer, Groningen, NL). Die Kontrollwerte zur Bestimmung der Radioligandenkonzentration wurden in Polyethylen-Szintillationsgefäßen (20ml, Ratiolab GmbH, Dreieich) mit Rotiszint Eco Plus Szintillationscocktail (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) versetzt und die Radioaktivität in einem Flüssigszintillationszähler (Tri Carb 2100TR, PerkinElmer, Groningen, NL) gemessen.

C.3 Fluoreszenzbasiertes funktionelles Calcium Assay

Das Calcium Assay wurde durch B. Höfgen aus dem Arbeitskreis Lehmann für Dopamin D₁, D₂ und D₅ Rezeptorsubtypen entwickelt und in der Literatur beschrieben [Hoefgen, 2002; Kassack et al., 2002b; Hoefgen et al., 2006]. Mit Hilfe dieses Assays können Aussagen zur Funktionalität von Liganden an den verschiedenen Rezeptorsubtypen getroffen werden.

C.3.1 Theoretische Grundlagen der Calcium-Fluoreszenz-Messung

Grundlage der Experimente ist die Messung des intrazellulären Anstiegs der Calciumkonzentration nach agonistischer Stimulation von rekombinanten Rezeptoren, die von stabil transfizierten Zellen exprimiert werden. Das agonistenvermittelte Calciumsignal ist dosisabhängig und kann in Anwesenheit eines Antagonisten, ebenfalls dosisabhängig, gehemmt werden. Die Bindung eines Agonisten an einen G-Protein gekoppelten Rezeptor löst bei der Mehrheit dieser Rezeptoren Signaltransduktionskaskaden aus, welche auf verschiedenen Wegen zu einem Anstieg des intrazellulären Calciumspiegels führen [Hoefgen, 2002; Kassack et al., 2002b]. Änderungen der intrazellulären Calciumkonzentration können nach Anfärben der Zellen mit einem calciumsensitiven Fluoreszenzfarbstoff (siehe Abschnitt C.3.5.3), dessen Fluoreszenzintensität durch die Komplexbildung von Calciumionen steigt, mit Hilfe eines Fluoreszenz-Microplate-Readers detektiert werden. Abbildung C-8 zeigt eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme suspendierter, angefärbter Zellen. Bei den grün fluoreszierenden Gebilden handelt es sich um intakte, farbstoffbeladene HEK D₁ Zellen, während die nicht grün angefärbten Strukturen abgestorbene oder zerstörte Zellen darstellen, welche keinen Farbstoff aufgenommen haben.

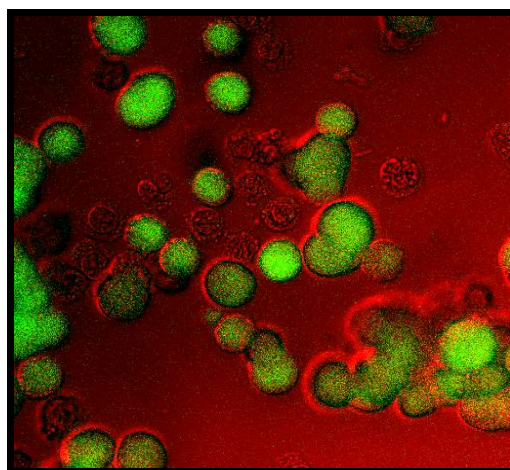


Abbildung C-8 überlagertes Transparent- und Fluoreszenzbild einer Suspension von HEK D₁ Zellen nach der Beladung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Oregon Green® BAPTA-1/AM

Puffer oder in Puffer gelöste Testsubstanzen werden automatisch in die vorbereitete Zellsuspension injiziert und dann über 30 Sekunden die Fluoreszenzintensität gemessen. Mit

dieser Methode lassen sich Dosis-Wirkungs-Kurven von Agonisten, sowie Dosis-Wirkungs-Kurven (Inhibitionskurven) nach Präinkubation der Zellen mit einer Verdünnungsreihe eines Antagonisten und Messung der calciumvermittelten Fluoreszenzintensität nach Zugabe eines Standardagonisten in fixer Konzentration aufnehmen.

Das Assay wurde im Arbeitskreis vorrangig zur Untersuchung von Antagonisten etabliert. agonistische Aktivität kann damit zwar festgestellt werden, es ist jedoch mit dieser Versuchsanordnung nicht möglich zwischen partiellen und vollen Agonisten zu unterscheiden. Bezüglich des Agonismus kann die Methode ausschließlich folgende Frage beantworten: Kann die Verbindung ein dosisabhängiges Calciumsignal auslösen und wenn ja, ist dieses Signal rezeptorvermittelt oder wird es durch andere Prozesse in der Zelle ausgelöst? Wenn eine Verbindung im Assay an den Rezeptorsubtyp exprimierenden Zellen eine agonistische Aktivität zeigt, wird zusätzlich ein Experiment an Wildtypzellen, die keine rekombinanten Rezeptoren tragen, durchgeführt. Löst die Verbindung an den Wildtypzellen kein dosisabhängiges Calciumsignal aus, so wird davon ausgegangen, dass das Signal, welches an Rezeptor exprimierenden Zellen ausgelöst wird, rezeptorvermittelt ist.

C.3.2 Durchführung der Experimente

Die Experimente wurden an lebenden HEK Zellen (siehe Abschnitt C.1.1) durchgeführt. Daher wurden alle verwendeten Lösungen auf 37°C temperiert, bevor sie mit den Zellen in Berührung gebracht wurden. Die Vitalität der Zellen war von großer Bedeutung für das Messergebnis. Optimale Ergebnisse wurden mit gut gepflegten Zellkulturen, die keinen unnötigen Stressfaktoren wie Substratmangel oder Temperaturschwankungen ausgesetzt worden waren, erzielt. Auch die mechanische Beanspruchung der Zellen durch Pipettieren und Zentrifugieren der Zellsuspension wirkte sich auf deren Reaktionsfähigkeit aus und sollte daher möglichst gering gehalten werden.

C.3.2.1 Anfärben der Zellen und Herstellung der Zellsuspension

Pro Experiment wurde eine zu 90% konfluente Kulturflasche benutzt. Überstehendes Medium wurde abgesaugt, 6ml Puffer auf die unbewachsene Seitenwand der Kulturflasche gegeben und vorsichtig über die Zellen geschwenkt, um restliches Nährmedium auszuspülen. Die Spülflüssigkeit wurde abgesaugt und der Spülvorgang wiederholt. Auf die Seitenwand der Kulturflasche wurden dann 5ml reiner Puffer und 1ml Puffer, der zuvor mit 3µl des Farbstoffes und 4µl Pluroniklösung (nichtionisches Tensid, siehe Abschnitt C.3.5.1) gemischt wurde, gegeben und durch Schwenken gemischt. Der Zellrasen wurde vorsichtig mit der Färbeflüssigkeit benetzt und die Platte unter Kulturbedingungen (siehe Abschnitt C.1.2) für 45 Minuten inkubiert. Nach 35 Minuten wurden die Zellen durch vorsichtiges Schlagen auf die Seitenwand der Kulturflasche von der Platte gelöst, in der Färbeflüssigkeit durch leichtes Schwenken suspendiert und bis zum Ende der Inkubationszeit in den

Brutschrank zurückgestellt. Nach beendeter Inkubation wurde die Suspension gleichmäßig auf zehn 1,5ml Reaktionsgefäße verteilt, die Kulturflasche mit 5ml Puffer nachgespült und die Spülflüssigkeit ebenfalls auf die zehn Gefäße verteilt. Die Suspension wurde abzentrifugiert (10000U/min, 10s, Eppendorf 5417C, Rotortyp F45-30-11, Eppendorf Zentrifugen GmbH, Leipzig) und der Überstand von allen Pellets abgesaugt. Je fünf der zehn Pellets wurden in 1ml Puffer in einem 1,5ml Reaktionsgefäß vereinigt, vorsichtig suspendiert und die zwei Gefäße erneut unter den oben beschriebenen Bedingungen zentrifugiert. Nach dem Entfernen des Überstandes wurden beide Zellpellets in 1ml Puffer vereinigt, vorsichtig suspendiert, die Suspension in einem 50ml Zentrifugenröhrchen mit 15ml vorgelegtem Puffer vereinigt und auf einem Minischüttler (Ika Labortechnik, Staufen) homogenisiert. Die Zellsuspension wurde zügig mit einer Mehrkanal-Pipette in die Wells einer 96er Mikrotiterplatte (klar, flacher Boden, Greiner Bio One, Frickenhausen) pipettiert, die Platte mit einem passenden Deckel locker verschlossen und für 30 Minuten unter Kulturbedingungen inkubiert.

Da sich die HEK Wildtypzellen nicht ohne Trypsin/EDTA-Behandlung von der Platte lösen ließen, wurde die Suspension dieser Zellen nach einem abweichenden Protokoll vorbereitet. Die Zellen wurden wie in Abschnitt C.1.2 beschrieben, trypsinisiert und ein Zellpellet gewonnen. Das Pellet wurde in 10ml Krebs-HEPES Puffer suspendiert, unter den in Abschnitt C.1.2 beschriebenen Bedingungen zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Die gewaschenen Zellen wurden in 6ml Puffer resuspendiert und im Zentrifugenröhrchen mit locker aufgelegtem Deckel für mindestens 30 Minuten unter Kulturbedingungen inkubiert. 3µl der Farbstofflösung wurden mit 1ml Puffer gemischt, diese Lösung der Zellsuspension zugesetzt und der Ansatz gut homogenisiert. Auf den Pluronik Zusatz wurde hier verzichtet. Anschließend wurden die Zellen mit der Farbstofflösung für 45 Minuten inkubiert und die Suspension währenddessen alle 15 Minuten homogenisiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen abzentrifugiert, in 2ml Puffer gewaschen, erneut abzentrifugiert und das Zellpellet wie oben beschrieben weiterverarbeitet.

C.3.2.2 Bestimmung der funktionellen Aktivität

Die Funktionalität von Verbindungen wurde in der Regel bestimmt, wenn die Substanzen im Grobscreening der Radioligandbindungsexperimente (siehe Abschnitt C.2.2.2) die Menge des gebundenen Radioliganden um mindestens 60% senkten. Zur Untersuchung der antagonistischen Aktivität wurde die nach Abschnitt C.3.2.1 vorbereitete Zellsuspension nach der 30-minütigen Ruhephase mit Testsubstanzlösungen steigender Konzentration versetzt und der Ansatz für 30 Minuten unter Kulturbedingungen inkubiert. Zur Erstellung einer Inhibitionskurve wurde mit elf Verdünnungen der Endkonzentrationen 100µM, 50µM, 10µM, 5µM, 1µM, 500nM, 100nM, 50nM, 10nM, 1nM und 100pM gearbeitet. Bei aktiveren Substanzen ($K_i < 100\text{nM}$) wurden noch geringer konzentrierte Lösungen verwendet. Jede

Konzentration wurde mindestens 4-fach bestimmt. Zur Bestimmung von Blindwert und Maximalantwort (100%-Wert), sowie zur Testung auf agonistische Aktivität, wurde der Zellsuspension in den Wells statt der Testsubstanz die gleiche Menge Puffer zugesetzt. Anschließend wurde nochmals, wie oben beschrieben, für 30 Minuten inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Platte in die auf 37°C temperierte Messkammer des Microplate Readers überführt und nacheinander, direkt nach der automatischen Injektion des Standardagonisten in das Well, die Fluoreszenz jeder Probe für 30 Sekunden gemessen. Die Zusammensetzung der Versuchsansätze mit einem Endvolumen von 200µl pro Well ist in Tabelle C-5 zusammengefasst.

Volumen [µl]	Bestandteil
160	Zellsuspension in Krebs-HEPES Puffer
	30 Minuten Inkubation
20	Verdünnungen der Testsubstanz oder Puffer (für Blindwert, Maximalwert oder Agonistentest)
	30 Minuten Inkubation
20 (wird vom Messgerät pipettiert)	Lösung des Standardagonisten oder Puffer (Blindwert) bzw. Verdünnungen der Testsubstanz (bei Agonistenexperimenten)

Tabelle C-5 Pipettierschema für die Versuchsansätze zur Bestimmung der funktionellen Aktivität

Zur Bestimmung der Blindwerte wurde statt des Standardagonisten die gleiche Menge Puffer injiziert. Die Maximalantwort wurde ermittelt, indem der Standardagonist in ausschließlich Zellsuspension und Puffer enthaltende Wells injiziert wurde. Um Verbindungen auf agonistische Aktivität zu testen, wurden Verdünnungen dieser Substanzen anstelle des Standardagonisten in die Zellsuspension injiziert. Dabei wurde mit vier Lösungen der Endkonzentrationen 100µM, 50µM, 10µM und 5µM gearbeitet. Lösten die Verbindungen in diesen Konzentrationen einen intrazellulären Calciumanstieg aus, so wurden vollständige Dosis-Wirkungs-Kurven aus einer Verdünnungsreihe mit elf Konzentrationen (wie weiter oben für die Inhibitionskurven beschrieben) erstellt. In diesem Fall konnte auf den zweiten Schritt des Pipettierschemas verzichtet werden, indem die Zellen in einer entsprechend größeren Menge Puffer suspendiert und 180µl dieser Zellsuspension (statt 160µl wie in Tabelle C-5 angegeben) in die Wells pipettiert wurden. Damit konnte eine der 30-minütigen Inkubationsphasen entfallen.

C.3.3 Auswertung der Messergebnisse

Die Fluoreszenzintensität wurde im Anschluss an die automatische Injektion alle 2 Sekunden über einen Zeitraum von 30 Sekunden gemessen und die Werte direkt in die Software Microsoft® Excel eingespeist. Aus den erhaltenen Daten konnte für jedes vermessene Well eine Fluoreszenzintensitäts-Zeit-Kurve erstellt werden. Die Differenz zwischen Minimum und Maximum jeder Kurve wurde ermittelt. Sie entspricht der durch die injizierte Substanz hervorgerufenen Änderung der intrazellulären Calciumkonzentration [Hoefgen, 2002]. Für die weitere Bearbeitung der Daten wurde die Software GraphPad Prism® verwendet. Die Differenzwerte aller Wells einer Konzentration wurden gemittelt und halblogarithmisch gegen die Konzentration aufgetragen. Die erhaltenen sigmoidalen Fluoreszenz-Konzentrations-Kurven wurden anhand nichtlinearer Regressionsanalyse unter Zugrundelegung der Funktion „sigmoidal-dose response“ (siehe auch Abschnitt C.2.2.3) ausgewertet. Aus den Dosis-Wirkungs-Kurven von Substanzen mit agonistischer Aktivität, wurde der EC_{50} -Wert ermittelt (halbmaximale effektorische Konzentration), welcher dem K_D -Wert (siehe Abschnitt C.2) entspricht. Antagonistenexperimente ergaben eine Inhibitorskurve, deren Wendepunkt dem IC_{50} -Wert (halbmaximale inhibitorische Konzentration) entsprach. Daraus wurde in Anlehnung an die Gleichung von Cheng und Prusoff [Cheng, Prusoff, 1973] (siehe auch Abschnitt C.2.2.3) ein apparenter K_i -Wert errechnet. Dabei wurden statt der Radioligandenkonzentration die Endkonzentration des Standardagonisten und anstelle des K_D -Wertes sein EC_{50} eingesetzt. Da die Anwendung der Gleichung nach Cheng und Prusoff die Gültigkeit des Massenwirkungsgesetzes und das Vorliegen eines Gleichgewichtszustandes voraussetzt, dessen Einstellung im Calcium Assay aufgrund des kurzlebigen Calciumsignals nicht abgewartet werden kann, wird mit dieser Methode kein wahrer K_i -Wert erhalten. Die apparenten K_i -Werte der funktionellen Calciumexperimente können daher nicht uneingeschränkt mit den K_i -Werten aus Gleichgewichtsexperimenten verglichen werden.

C.3.4 Etablierung des funktionellen Calcium Assays an 5-HT_{2A} Rezeptor exprimierenden Zelllinien und Dopamin D₃ Zelllinien

Die Zellen wurden, wie in Abschnitt C.3.2.1 beschrieben, angefärbt und der Erfolg der Färbung fluoreszenzmikroskopisch überprüft. Die 5-HT_{2A} Zellen zeigten dabei, wie auch die bereits erwähnten Wildtypzellen, die Eigenschaft, sich nur durch Trypsin/EDTA Behandlung von der Platte lösen zu lassen. Daher wurden sie nach dem für die Wildtypzellen entwickelten Verfahren behandelt. Es wurde untersucht, ob durch die Einwirkung eines geeigneten Agonisten (siehe Abschnitt C.3.5.2) ein reproduzierbares, dosisabhängiges Calciumsignal hervorgerufen werden kann. Dabei wurde nach der in Abschnitt C.3.2.2 beschriebenen Methode zur Untersuchung von Agonisten verfahren. Nach Erstellen von Dosis-Wirkungs-Kurven der Agonisten an den entsprechenden Rezeptoren wurden die

Experimente mit Wildtypzellen wiederholt, um eine rezeptorvermittelte Wirkung der Agonisten sicherzustellen. Aus mehreren Experimenten mit voneinander unabhängigen Verdünnungsreihen der Agonisten wurden die EC_{50} -Werte der Agonisten ermittelt, welche gleichzeitig auch deren K_D -Werte darstellen (siehe Abschnitt C.3.3). Die untersuchten Verbindungen wurden anschließend als Standardagonisten zur Untersuchung von Antagonisten verwendet. Anhand der 5-HT_{2A} Zellen wurde außerdem untersucht, ob die Experimente sich auch mit reduzierter Farbstoffkonzentration durchführen lassen. Dazu wurden Dosis-Wirkungs-Kurven des Standardagonisten mit voller (3µl 0,5mM Lösung) und halber (1,5µl 0,5mM Lösung) Farbstoffmenge aufgenommen.

C.3.5 Materialien

C.3.5.1 Reagenzien und Puffer

Als Wasch-und Messpuffer wurde ein Krebs-HEPES Puffer (in Kapitel C.3 als Puffer bezeichnet) folgender Zusammensetzung verwendet: Natriumchlorid 118,6mM, Kaliumchlorid 4,7mM, Magnesiumsulfat 1,2mM, Kaliumdihydrogenphosphat 1,2mM, Natriumhydrogencarbonat 4,2mM, D-Glucose·H₂O 11,7mM, Calciumchlorid·2H₂O 1,3mM, HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure) 10mM (alle Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen), dessen pH Wert mit 1N NaOH auf pH 7,4 eingestellt wurde.

Die Testsubstanzen wurden auf 0,1mg genau eingewogen (Präzisionswaage, Denver Instrument GmbH, Göttingen) und zur Herstellung einer 10mM Stammlösung in Dimethylsulfoxid gelöst. Die Stammlösungen wurden bei -20°C gelagert. Aus der Stammlösung wurden vor jedem Experiment Verdünnungen der Testsubstanzen in Krebs-HEPES Puffer hergestellt.

Zusammen mit dem Farbstoff wird den Zellen eine 20%ige (m/V) Lösung von Pluronic F127 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) in Dimethylsulfoxid zugesetzt. Es handelt sich hier um ein nichtionisches Tensid, was sowohl die Wasserlöslichkeit des Farbstoffes, als auch dessen Aufnahme in die Zellen verbessern soll [Hoefgen, 2002].

C.3.5.2 Standardagonisten

Als Standardagonisten werden diejenigen Agonisten bezeichnet, welche in konstanter Konzentration, den mit verschiedenen Konzentrationen eines Antagonisten präinkubierten Ansätzen zugesetzt werden, um die dosisabhängige Hemmung des agonistenvermittelten Calciumsignals zu untersuchen. Das Benzazepin SKF38393 wurde als Standardagonist für die Rezeptoren der D₁ Familie verwendet. Für die D₂ und D₃ Rezeptoren wurde das Chinolin

Quinpirol eingesetzt. Höfgen [Hoefgen, 2002] konnte zeigen, dass diese Agonisten an den untersuchten D_1 , D_2 und D_5 Rezeptoren ein rezeptorvermitteltes, reproduzierbares und dosisabhängiges Calcium-Fluoreszenz-Signal auslösten. Die Experimente mit 5-HT_{2A} Zellen wurden mit dem substituierten Phenylethylamin DOI (2,5-Dimethoxy-4-iodoamphetamin) durchgeführt. Die Standardagonisten wurden in einer Endkonzentration von 100nM eingesetzt.

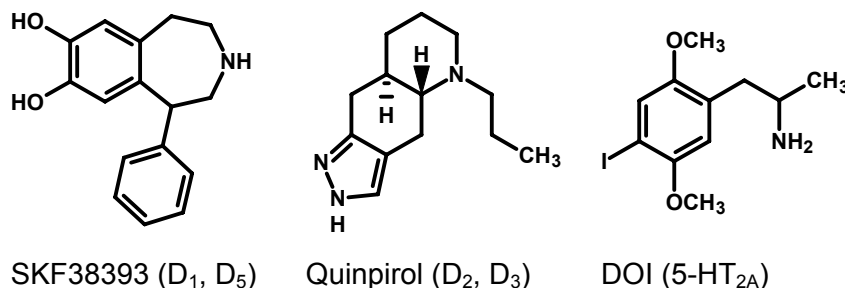


Abbildung C-9 Standardagonisten

C.3.5.3 Fluoreszenzfarbstoff

Für die Experimente wurde der Fluoreszenzfarbstoff Oregon Green[®] 488 BAPTA-1/AM (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) verwendet. Dabei handelt es sich um die Fluorescein ähnliche Verbindung Oregon Green 488[®], welche mit dem calciumspezifischen Chelatbildner BAPTA ((1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid)) verknüpft ist. Die BAPTA-Gruppe verfügt über vier Carbonsäuregruppen, welche als Acetoxymethyl(AM)-Ester vorliegen, so dass das ungeladene Molekül gut in die Zelle eindringen kann. Im Zellinneren werden alle Esterbindungen durch die Einwirkung von Esterasen gespalten und es entsteht ein geladenes Molekül, welches die Zelle nur schlecht wieder verlassen kann. Außerdem wird durch die freien Carboxygruppen die Komplexbildung von zwei Calciumionen ermöglicht. Durch die Bindung der Calciumionen wird die Fluoreszenzintensität des Farbstoffs gegenüber dem freien Farbstoff um das 14-fache erhöht. Das Absorptions- bzw. Emissionsmaximum des Calcium-Farbstoff Komplexes liegt bei 494nm bzw. 523nm [Hoefgen, 2002]. Der Farbstoff wurde in Dimethylsulfoxid zu 0,5mmol/l gelöst und je 3µl dieser Lösung für die Experimente verwendet. Experimente mit 5-HT_{2A} Zellen wurden mit halbiertem Farbstoffkonzentration durchgeführt

C.3.5.4 Fluoreszenz Microplate Reader

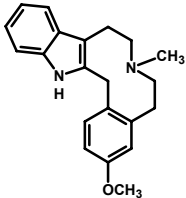
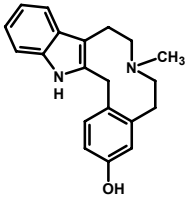
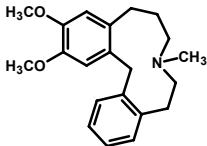
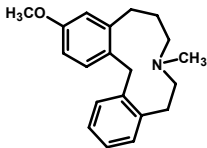
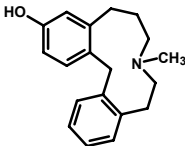
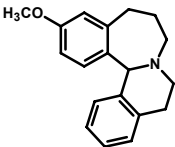
Da das rezeptorvermittelte Calciumsignal sein Maximum 10 bis 30 Sekunden nach der Applikation eines Agonisten erreicht und schnell wieder abklingt, wurde ein Fluoreszenz Microplate Reader mit integriertem Injektorsystem (NOVOstar Microplate Reader, BMG Labtech GmbH, Offenburg) verwendet. Direkt nach der Injektion in ein Well, wurde alle zwei Sekunden die Fluoreszenz über einen Zeitraum von 30 Sekunden aufgezeichnet. Die am

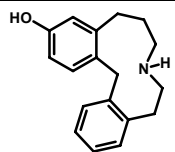
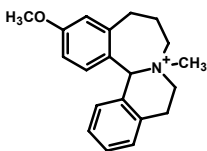
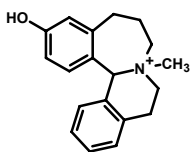
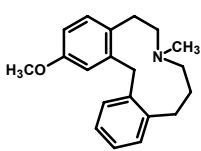
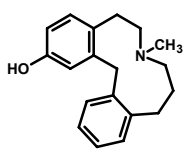
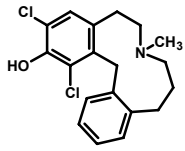
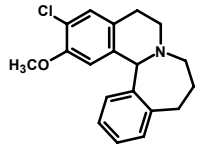
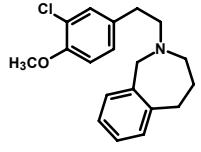
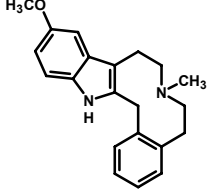
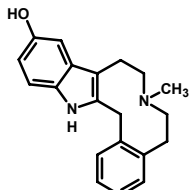
Gerät eingestellten Parameter der verwendeten Methode sind bei Mohr [Mohr, 2005] beschrieben.

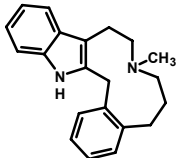
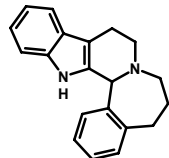
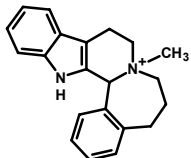
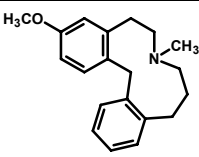
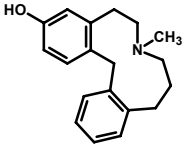
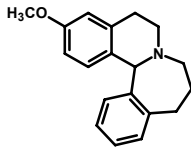
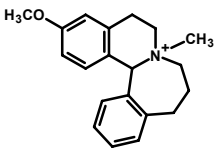
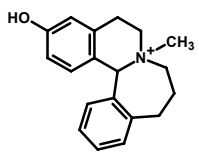
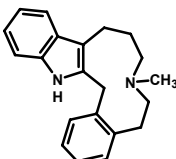
C.4 Testsubstanzen

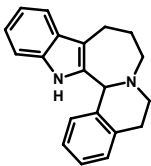
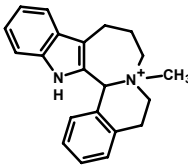
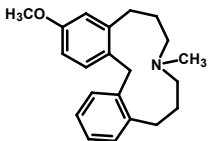
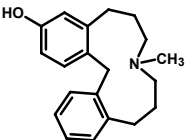
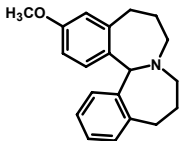
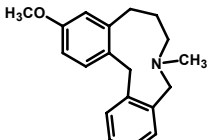
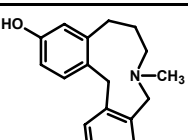
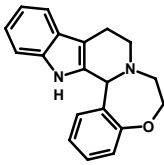
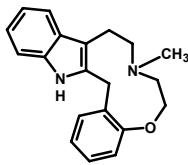
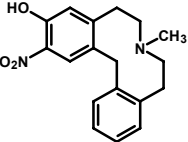
Die Testsubstanzen wurden dankenswerterweise von Mitgliedern des Arbeitskreises sowie von Kooperationspartnern aus Kairo (Ägypten) und Debreczin (Ungarn) zur Verfügung gestellt. Zwei Substanzen stammen aus eigener Synthesearbeit. Angaben zu Synthese, Eigenschaften und Struktursicherung sind den im Folgenden angegebenen Literaturstellen bzw. dem allgemeinen und dem experimentellen Teil zu entnehmen.

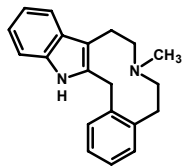
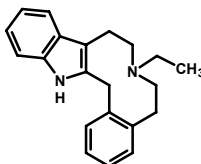
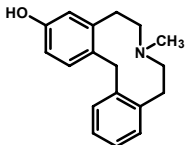
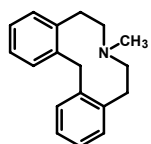
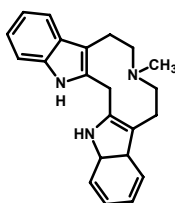
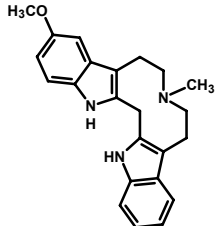
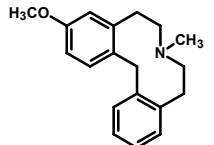
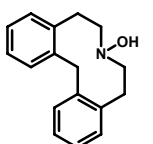
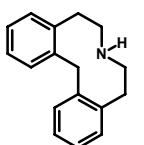
C.4.1 Azecine und azecinverwandte Verbindungen aus dem Arbeitskreis

Substanzcode Dissertation (weitere Chiffren)	Struktur	Bezugsquelle
CE500 (LE-CE-500) (194)		Synthese im Rahmen des Wahlpflichtfachs unter Betreuung von C. Enzensperger [Enzensperger et al., 2007a]
CE501 (LE-CE-501) (195)		Synthese im Rahmen des Wahlpflichtfachs unter Betreuung von C. Enzensperger [Enzensperger et al., 2007a]
CE510 (LE-CE-510) (162)		Synthese: C. Enzensperger (AK Lehmann) [Enzensperger et al., 2007b]
CE520 (LE-CE-520) (163)		Synthese: C. Enzensperger (AK Lehmann) [Enzensperger et al., 2007b]
CE521 (LE-CE-521) (164)		Synthese: C. Enzensperger (AK Lehmann) [Enzensperger et al., 2007b]
CE522 (LE-CE-522) (165)		Synthese: C. Enzensperger (AK Lehmann) [Enzensperger et al., 2007b]

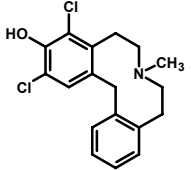
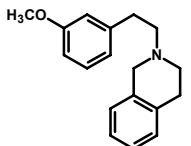
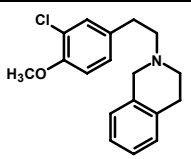
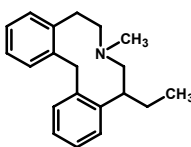
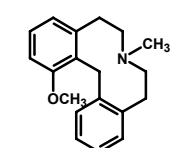
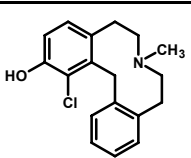
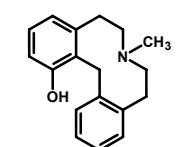
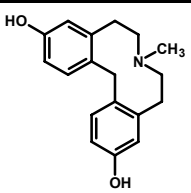
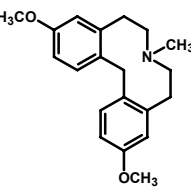
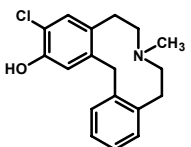
Substanzcode Dissertation (weitere Chiffren)	Struktur	Bezugsquelle
CE523 (LE-CE-523) (168)		Synthese: C. Enzensperger (AK Lehmann) [Enzensperger et al., 2007b]
CE526 (LE-CE-526)		Synthese: C. Enzensperger (AK Lehmann) [Enzensperger et al., 2007b]
CE527 (LE-CE-527) (167)		Synthese: C. Enzensperger (AK Lehmann) [Enzensperger et al., 2007b]
CE530 (LE-CE-530) (169)		Synthese: C. Enzensperger (AK Lehmann) [Enzensperger et al., 2007b]
CE531 (LE-CE-531) (170)		Synthese: C. Enzensperger (AK Lehmann) [Enzensperger et al., 2007b]
CE541 (LE-CE-541) (171)		Synthese: C. Enzensperger (AK Lehmann) [Enzensperger et al., 2007b]
CE542 (LE-CE-542) (172)		Synthese: C. Enzensperger (AK Lehmann) [Enzensperger et al., 2007b]
CE544 (LE-CE-544) (188)		Synthese: C. Enzensperger (AK Lehmann) [Enzensperger et al., 2007b]
CE550 (LE-CE-550) (174)		Synthese: C. Enzensperger (AK Lehmann) [Enzensperger et al., 2007a]
CE551 (LE-CE-551) (175)		Synthese: C. Enzensperger (AK Lehmann) [Enzensperger et al., 2007a]

Substanzcode Dissertation (weitere Chiffren)	Struktur	Bezugsquelle
CE560 (LE-CE-560) (179)		Synthese: C. Enzensperger (AK Lehmann) [Enzensperger, Lehmann, 2006]
CE562 (LE-CE-562) (180)		Synthese: C. Enzensperger (AK Lehmann) [Enzensperger, Lehmann, 2006]
CE566 (LE-CE-566) (181)		Synthese: C. Enzensperger (AK Lehmann) [Enzensperger, Lehmann, 2006]
CE570 (LE-CE-570) (183)		Synthese: C. Enzensperger (AK Lehmann) [Enzensperger et al., 2007b]
CE571 (LE-CE-571) (185)		Synthese: C. Enzensperger (AK Lehmann) [Enzensperger et al., 2007b]
CE572 (LE-CE-572) (189)		Synthese: C. Enzensperger (AK Lehmann) [Enzensperger et al., 2007b]
CE576 (LE-CE-576) (182)		Synthese: C. Enzensperger (AK Lehmann) [Enzensperger et al., 2007b]
CE577 (LE-CE-577) (184)		Synthese: C. Enzensperger (AK Lehmann) [Enzensperger et al., 2007b]
CE580 (LE-CE-580) (187)		Synthese: C. Enzensperger (AK Lehmann) [Enzensperger, Lehmann, 2006]

Substanzcode Dissertation (weitere Chiffren)	Struktur	Bezugsquelle
CE582 (LE-CE-582) (190)		Synthese: C. Enzensperger (AK Lehmann) [Enzensperger, Lehmann, 2006]
CE586 (LE-CE-586) (186)		Synthese: C. Enzensperger (AK Lehmann) [Enzensperger, Lehmann, 2006]
CE590 (LE-CE-590) (191)		Synthese: C. Enzensperger (AK Lehmann) [Enzensperger et al., 2007b]
CE591 (LE-CE-591) (192)		Synthese: C. Enzensperger (AK Lehmann) [Enzensperger et al., 2007b]
CE592 (LE-CE-592) (193)		Synthese: C. Enzensperger (AK Lehmann) [Enzensperger et al., 2007b]
CE5A0 (MM75Me) (279)		Synthese: C. Enzensperger (AK Lehmann) [Schulze et al., 2009]
CE5A1 (280)		Synthese: C. Enzensperger (AK Lehmann) [Schulze et al., 2009]
FM5 (266)		Eigene Synthese
FM7 (267)		Eigene Synthese
FS3 (LE-PM-456) (160)		Synthese im Rahmen des Wahlpflichtfachs unter Betreuung von P. Mohr [Mohr et al., 2006]

Substanzcode Dissertation (weitere Chiffren)	Struktur	Bezugsquelle
LE300 (LE-RU-300) (34)		Synthese: T. Witt (AK Lehmann) [Witt et al., 2000]
LE301 (LE-RU-301) (35)		Synthese: D. Rudolf (AK Lehmann) [Rudolf, 1999]
LE404 (LE-404) (44)		Synthese: P. Schweikert (AK Lehmann) [Hoefgen et al., 2006]
LE410 (LE-410) (43)		Synthese: P. Schweikert (AK Lehmann) [Schweikert, 1999]
LE441 (LE-RU-441) (TW64) (394)		Synthese: T. Witt (AK Lehmann) [Witt et al., 2000]
MI506 (LE-MI-506) (202)		Synthese: Mohamed Ibrahim (AK Lehmann) Diplomarbeit
PM20 (LE-PM-425) (128)		Synthese: P. Mohr (AK Lehmann) [Hoefgen et al., 2006]
PM22-3 (LE-PM-433) (136)		Synthese: P. Mohr (AK Lehmann) [Mohr, 2005]
PM22b (LE-PM-432) (135)		Synthese: P. Mohr (AK Lehmann) [Mohr, 2005]

Substanzcode Dissertation (weitere Chiffren)	Struktur	Bezugsquelle
PM40 (LE-PM-429) (132)		Synthese: P. Mohr (AK Lehmann) [Mohr et al., 2006]
PM53 (LE-PM-427) (130)		Synthese: P. Mohr (AK Lehmann) [Mohr, 2005]
PM58 (LE-PM-434) (137)		Synthese: P. Mohr (AK Lehmann) [Mohr et al., 2006]
PM65a (LE-PM-435) (138)		Synthese: P. Mohr (AK Lehmann) [Mohr, 2005]
PM77 (LE-PM-428) (131)		Synthese: P. Mohr (AK Lehmann) [Mohr et al., 2006]
PM78 (LE-PM-426) (129)		Synthese: P. Mohr (AK Lehmann) [Mohr, 2005]
PM83 (LE-PM-436) (139)		Synthese: P. Mohr (AK Lehmann) [Mohr et al., 2006]
PM92 (LE-PM-437) (141)		Synthese: P. Mohr (AK Lehmann) [Mohr, 2005]
PM98 (LE-PM-443) (147)		Synthese: P. Mohr (AK Lehmann) [Mohr et al., 2006]
PM103 (LE-PM-440) (144)		Synthese: P. Mohr (AK Lehmann) [Mohr, 2005]

Substanzcode Dissertation (weitere Chiffren)	Struktur	Bezugsquelle
PM124 (LE-PM-442) (146)		Synthese: P. Mohr (AK Lehmann) [Mohr et al., 2006]
PM126 (LE-PM-444) (148)		Synthese: P. Mohr (AK Lehmann) [Mohr, 2005]
PM127 (LE-PM-445) (149)		Synthese: P. Mohr (AK Lehmann) [Mohr, 2005]
PM130 (LE-PM-446) (150)		Synthese: P. Mohr (AK Lehmann) [Mohr, 2005]
PM145 (LE-PM-448) (152)		Synthese: P. Mohr (AK Lehmann) [Mohr et al., 2006]
PM147 (LE-PM-452) (156)		Synthese: P. Mohr (AK Lehmann) [Mohr et al., 2006]
PM148 (LE-PM-449) (153)		Synthese: P. Mohr (AK Lehmann) [Mohr et al., 2006]
PM153 (LE-PM-451) (155)		Synthese: P. Mohr (AK Lehmann) [Mohr et al., 2006]
PM154 (LE-PM-453) (157)		Synthese: P. Mohr (AK Lehmann) [Mohr et al., 2006]
PM155 (LE-PM-454) (158)		Synthese: P. Mohr (AK Lehmann) [Mohr et al., 2006]

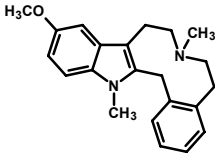
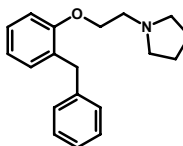
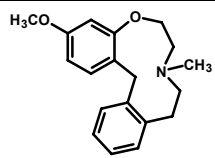
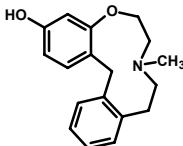
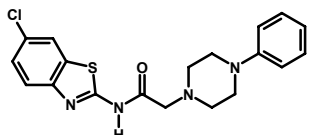
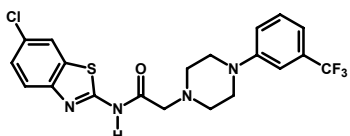
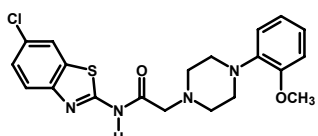
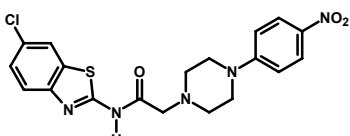
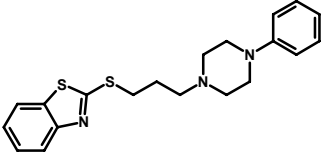
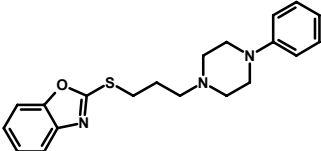
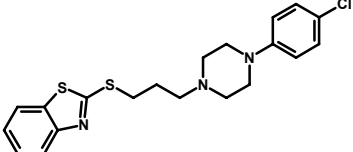
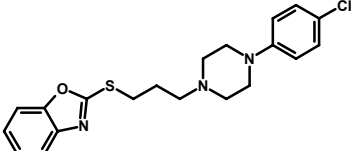
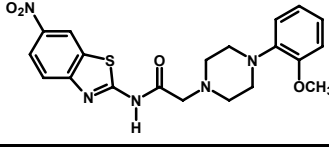
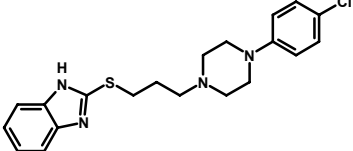
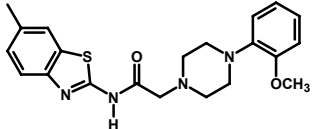
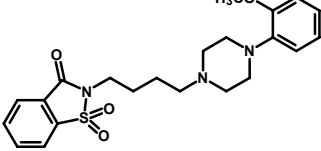
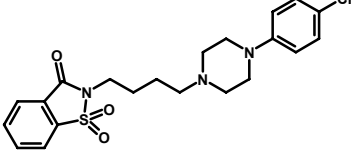
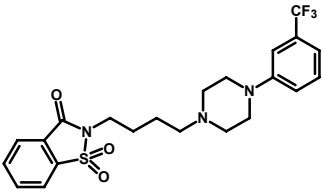
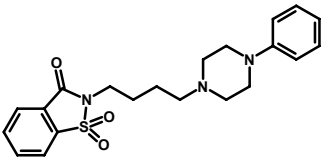
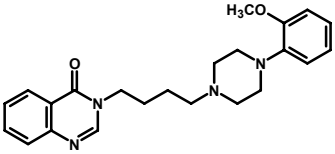
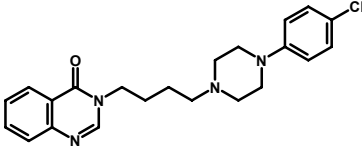
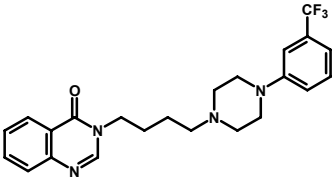
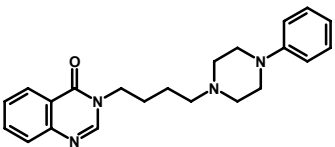
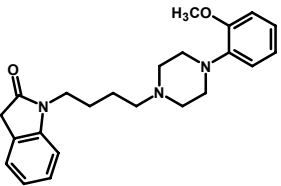
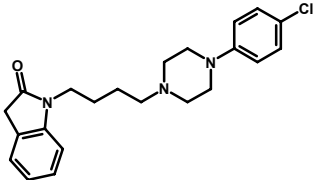
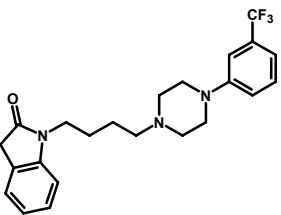
Substanzcode Dissertation (weitere Chiffren)	Struktur	Bezugsquelle
SM (200)		Synthese im Rahmen des Wahlpflichtfachs unter Betreuung von C. Enzensperger [Enzensperger et al., 2007a]
WW33 (LE-WW-454) (117)		Synthese: T. Wittig (AK Lehmann) [Wittig et al., 2004]
WW60 (LE-WW-450) (113)		Synthese: T. Wittig (AK Lehmann) [Wittig et al., 2003]
WW84 (LE-WW-451) (114)		Synthese: T. Wittig (AK Lehmann) [Wittig et al., 2004]

Tabelle C-6 Strukturen der untersuchten Azecine und ähnlicher Verbindungen aus dem Arbeitskreis

C.4.2 Arylpiperazine

Substanzcode Dissertation (weitere Chiffren)	Struktur	Bezugsquelle
AD6 (226)		Synthese: D. Abou El Ella (Kairo, Ägypten) [Abou El Ella, Müller, 2007]
AD10b (227)		Synthese: D. Abou El Ella (Kairo, Ägypten) [Abou El Ella, Müller, 2007]
AD12 (228)		Synthese: D. Abou El Ella (Kairo, Ägypten) [Abou El Ella, Müller, 2007]
AD15 (229)		Synthese: D. Abou El Ella (Kairo, Ägypten) [Abou El Ella, Müller, 2007]

Substanzcode Dissertation (weitere Chiffren)	Struktur	Bezugsquelle
AD24 (230)		Synthese: D. Abou El Ella (Kairo, Ägypten) [Abou El Ella, Müller, 2007]
AD25 (231)		Synthese: D. Abou El Ella (Kairo, Ägypten) [Abou El Ella, Müller, 2007]
AD27 (232)		Synthese: D. Abou El Ella (Kairo, Ägypten) [Abou El Ella, Müller, 2007]
AD29 (233)		Synthese: D. Abou El Ella (Kairo, Ägypten) [Abou El Ella, Müller, 2007]
AD30 (235)		Synthese: D. Abou El Ella (Kairo, Ägypten) [Abou El Ella, Müller, 2007]
AD31 (234)		Synthese: D. Abou El Ella (Kairo, Ägypten) [Abou El Ella, Müller, 2007]
AD34 (236)		Synthese: D. Abou El Ella (Kairo, Ägypten) [Abou El Ella, Müller, 2007]
AHA-F5 (203)		Synthese: A. Abadi und Mitarbeiter (Kairo, Ägypten) [Awadallah et al., 2007]
AHA-F6 (204)		Synthese: A. Abadi und Mitarbeiter (Kairo, Ägypten) [Awadallah et al., 2007]

Substanzcode Dissertation (weitere Chiffren)	Struktur	Bezugsquelle
AHA-F7 (205)		Synthese: A. Abadi und Mitarbeiter (Kairo, Ägypten) [Awadallah et al., 2007]
AHA-F8 (206)		Synthese: A. Abadi und Mitarbeiter (Kairo, Ägypten) [Awadallah et al., 2007]
AHA-F13 (211)		Synthese: A. Abadi und Mitarbeiter (Kairo, Ägypten) [Awadallah et al., 2007]
AHA-F14 (212)		Synthese: A. Abadi und Mitarbeiter (Kairo, Ägypten) [Awadallah et al., 2007]
AHA-F15 (213)		Synthese: A. Abadi und Mitarbeiter (Kairo, Ägypten) [Awadallah et al., 2007]
AHA-F16 (214)		Synthese: A. Abadi und Mitarbeiter (Kairo, Ägypten) [Awadallah et al., 2007]
AHA-F17 (215)		Synthese: A. Abadi und Mitarbeiter (Kairo, Ägypten) [Awadallah et al., 2007]
AHA-F18 (216)		Synthese: A. Abadi und Mitarbeiter (Kairo, Ägypten) [Awadallah et al., 2007]
AHA-F19 (217)		Synthese: A. Abadi und Mitarbeiter (Kairo, Ägypten) [Awadallah et al., 2007]

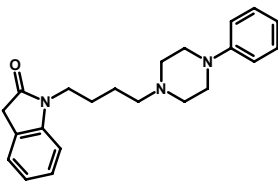
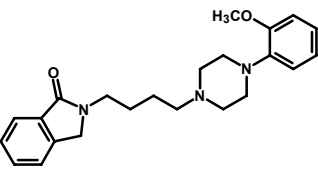
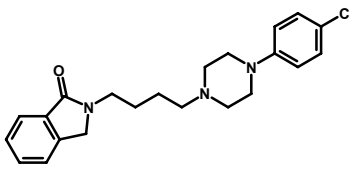
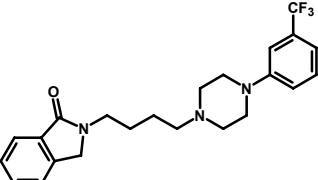
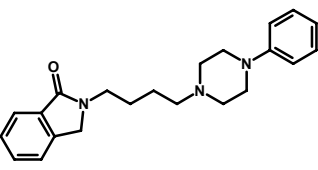
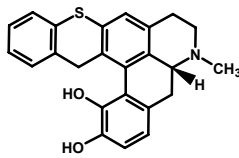
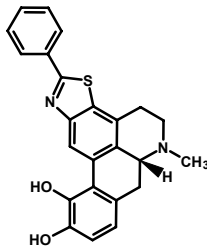
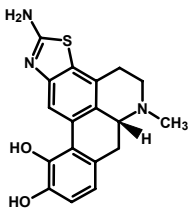
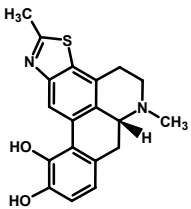
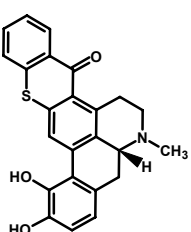
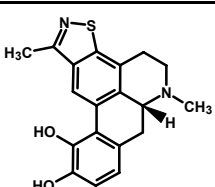
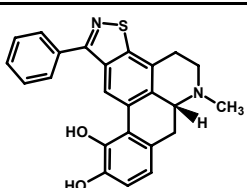
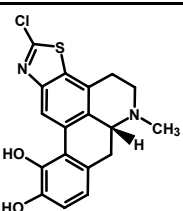
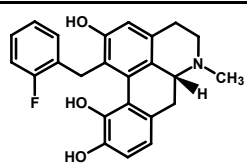
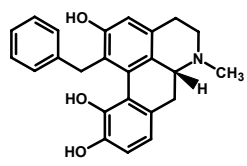
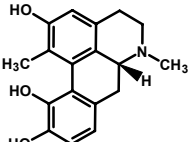
Substanzcode Dissertation (weitere Chiffren)	Struktur	Bezugsquelle
AHA-F20 (218)		Synthese: A. Abadi und Mitarbeiter (Kairo, Ägypten) [Awadallah et al., 2007]
AHA-F21 (219)		Synthese: A. Abadi und Mitarbeiter (Kairo, Ägypten) [Awadallah et al., 2007]
AHA-F22 (220)		Synthese: A. Abadi und Mitarbeiter (Kairo, Ägypten) [Awadallah et al., 2007]
AHA-F23 (221)		Synthese: A. Abadi und Mitarbeiter (Kairo, Ägypten) [Awadallah et al., 2007]
AHA-F24 (222)		Synthese: A. Abadi und Mitarbeiter (Kairo, Ägypten) [Awadallah et al., 2007]

Tabelle C-7 Strukturen der untersuchten Alkylpiperazine

C.4.3 Apomorphinderivate

Substanzcode Dissertation (weitere Chiffren)	Struktur	Bezugsquelle
AM1 (246)		Synthese: A. Sipos und Mitarbeiter (Debreczin, Ungarn) [Sipos et al., 2008a]
AM2 (247)		Synthese: A. Sipos und Mitarbeiter (Debreczin, Ungarn) [Sipos et al., 2009a]

AM3 (248)		Synthese: A. Sipos und Mitarbeiter (Debreczin, Ungarn) [Sipos et al., 2009a]
AM4 (249)		Synthese: A. Sipos und Mitarbeiter (Debreczin, Ungarn) [Sipos et al., 2009a]
AM5 (250)		Synthese: A. Sipos und Mitarbeiter (Debreczin, Ungarn) [Sipos et al., 2008a]
AM6 (251)		Synthese: A. Sipos und Mitarbeiter (Debreczin, Ungarn) [Sipos et al., 2009a]
AM7 (252)		Synthese: A. Sipos und Mitarbeiter (Debreczin, Ungarn) [Sipos et al., 2009a]
AM8 (253)		Synthese: A. Sipos und Mitarbeiter (Debreczin, Ungarn) [Sipos et al., 2009a]
AM1a (254)		Synthese: A. Sipos und Mitarbeiter (Debreczin, Ungarn) Publikation in Vorbereitung
AM2a (255)		Synthese: A. Sipos und Mitarbeiter (Debreczin, Ungarn) Publikation in Vorbereitung
AM3a (256)		Synthese: A. Sipos und Mitarbeiter (Debreczin, Ungarn) Publikation in Vorbereitung

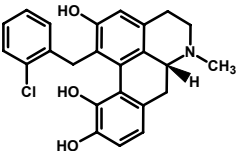
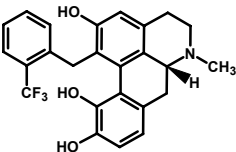
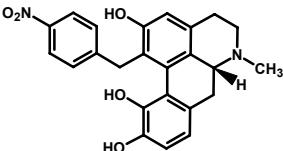
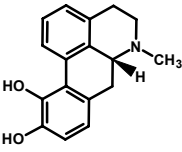
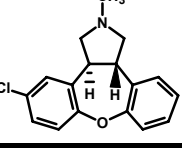
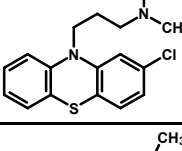
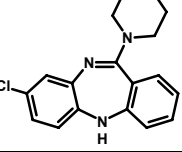
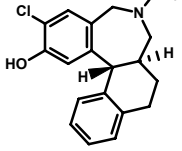
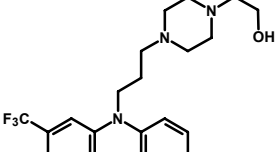
AM4a (257)		Synthese: A. Sipos und Mitarbeiter (Debreczin, Ungarn) Publikation in Vorbereitung
AM5a (258)		Synthese: A. Sipos und Mitarbeiter (Debreczin, Ungarn) Publikation in Vorbereitung
AM6a (259)		Synthese: A. Sipos und Mitarbeiter (Debreczin, Ungarn) Publikation in Vorbereitung

Tabelle C-8 Strukturen der untersuchten Apomorphinderivate

C.4.4 Referenzsubstanzen

Substanzcode Dissertation (weitere Chiffren)	Struktur	Bezugsquelle
Apomorphin (AM1b) (451)		Synthese: A. Sipos und Mitarbeiter (Debreczin, Ungarn)
Asenapin (535)		Toronto Research Chemicals (Toronto, Kanada)
Chlorpromazin (387)		Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland)
Clozapin (463)		Molekula (Vaterstetten, Deutschland)
Ecopipam (SCH-39166) (534)		Tocris Bioscience (Bristol, U.K.)
Fluphenazin (389)		Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland)

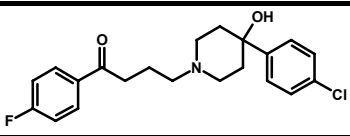
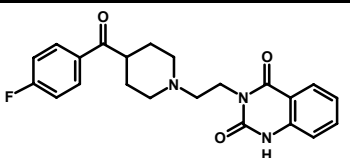
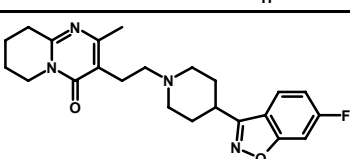
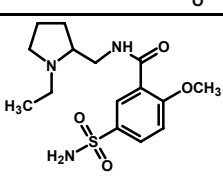
Substanzcode Dissertation (weitere Chiffren)	Struktur	Bezugsquelle
Haloperidol (390)		Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland)
Ketanserin (462)		Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland)
Risperidon (536)		PromoChem GmbH (Wesel, Deutschland)
Supirid (464)		Molekula (Vaterstetten, Deutschland)

Tabelle C-9 Strukturen bekannter Referenzsubstanzen

D ERGEBNISSE UND DISKUSSION

D.1 Etablierung der Radioligandbindungsstudie an 5-HT_{2A}, D₂ und D₃ Rezeptor exprimierenden Zelllinien

Die HEK 5-HT_{2A}, HEK D₂ und HEK D₃ Zelllinien konnten erfolgreich zur Untersuchung von potentiellen Liganden mit der Radioligandbindungsmethode etabliert werden. Die gewonnenen Bindungsdaten sind dem Abschnitt D.3 zu entnehmen.

D.1.1 Charakterisierung der eingesetzten Zelllinien

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen nach Bradford und Lowry, die Berechnung von B_{max}- und K_D- Werten aus Radioligandenexperimenten und die Calcium-Fluoreszenz-Messungen zur Ermittlung der EC₅₀ der Standardagonisten, ergaben folgende Resultate:

Zelllinie	Protein-konzentration [µg/ml]	B _{max} [fmol/mg Protein]	K _D [nM]	Radioligand	EC ₅₀ [nM]	Standard-agonist
HEK 5-HT _{2A}	610 ± 120 (n = 5)	154 ± 23 (n = 5)	0,93	[³ H]Spiperon	4,4	DOI
HEK D _{2L}	252 ± 50 (n = 4)	187 (n = 4)	0,77	[³ H]Spiperon	2,8 ^b	Quinpirol
HEK D ₃	249 ± 60 (n = 4)	277 (n = 3)	0,66	[³ H]Spiperon	2,8	Quinpirol
HEK D ₁	1260 ^a	3139 ^a	0,19 ^a	[³ H]SCH23390	2,2 ^b	SKF38393
HEK D ₅	1540 ^a	6087 ^a	0,11 ^a	[³ H]SCH23390	1,5 ^b	SKF38393
CHO D _{2L}	370 ^a	4261 ^a	0,77 ^a	[³ H]Spiperon	-	-
CHO D ₃	130 ^a	14474 ^a	3,01 ^a	[³ H]Spiperon	-	-
CHO D _{4.4}	940 ^a	6043 ^a	0,21 ^a	[³ H]Spiperon	-	-

Tabelle D-1 Ergebnisse der Charakterisierung der Zelllinien, ^a die Bestimmung erfolgte durch Thomas Wittig aus dem Arbeitskreis, ^b die Messungen führte Heidi Traber durch

D.1.2 Anteil der spezifischen Bindung an der Gesamtbindung

Der Anteil der spezifischen Bindung an der Gesamtbindung ist ein Maß für die Qualität einer Assay Methode. Entfallen 90% der Gesamtbindung auf die spezifische Bindung, so gilt die Methode als exzellent. Bei einem Anteil der spezifischen Bindung von weniger als 50% sollte die Methode überarbeitet werden (siehe auch Abschnitt C.2.1.2.).

Aus Tabelle D-2 ist zu entnehmen, dass der Anteil der spezifischen Bindung bei allen im Arbeitskreis etablierten Radioligandbindungsmethoden oberhalb von 80% liegt. Die Assays an HEK 5-HT_{2A}, HEK D_{2L}, HEK D₁, HEK D₅ und CHO D_{4.4} Zelllinien haben sogar einen Anteil von über 90%. Das neu etablierte D₂ Assay mit HEK D₂ Zellen zeigt gegenüber den CHO D₂ Experimenten eine um 8% gesteigerte spezifische Bindung.

Zelllinie	eingesetzte Radioligandenkonzentration [nM]	Spezifische Bindung [%] MW ± SEM	
HEK 5-HT _{2A}	~0,25	92,03 ± 2,23	(n = 8)
HEK D _{2L}	~0,25	93,75 ± 1,93	(n = 5)
HEK D ₃	~0,25	81,88 ± 2,57	(n = 5)
HEK D ₁	~0,15	92,56 ± 3,08	(n = 5)
HEK D ₅	~0,25	94,69 ± 1,68	(n = 6)
CHO D _{2L}	~0,25	85,81 ± 4,72	(n = 5)
CHO D ₃	~0,15~	83,78 ± 5,92	(n = 5)
CHO D _{4.4}	~0,15~	92,70 ± 0,81	(n = 5)

Tabelle D-2 Anteil der spezifischen Bindung an der Gesamtbindung, MW = Mittelwert, SEM = mittlere Abweichung vom Mittelwert (standard error of the mean), n = Anzahl betrachteter Experimente

D.1.3 Anteil des gebundenen Radioliganden an der Gesamtkonzentration

Um die in den Abschnitten C.2.1.2 und C.2.1.3 beschriebenen Modelle (Sättigungsisotherme und Gleichung nach Cheng und Prusoff) anwenden zu können, dürfen maximal 10% der eingesetzten Radioligandenmenge gebunden vorliegen. Ist diese Bedingung erfüllt, kann die eingesetzte Radioligandenkonzentration der Konzentration an ungebundenem Radioliganden gleichgesetzt werden. Tabelle D-3 zeigt den durchschnittlich gebundenen Radioligandenanteil der Experimente der verschiedenen Zelllinien. Die gestellte Bedingung wird von allen Assays erfüllt. Mit Ausnahme des HEK D₁ Assays liegt der Wert bei allen Zelllinien unter 8%. Bei HEK D₁ Experimenten ist der Anteil des gebundenen Radioliganden grenzwertig, da hier eine relativ geringe Radioligandenkonzentration verwendet wurde. Der gebundene Radioligandenanteil könnte gesenkt werden, indem eine geringere Anzahl

Rezeptoren oder eine höhere Radioligandenkonzentration verwendet wird, was aber wiederum auch den Anteil der spezifischen Bindung an der Gesamtbindung beeinflusste.

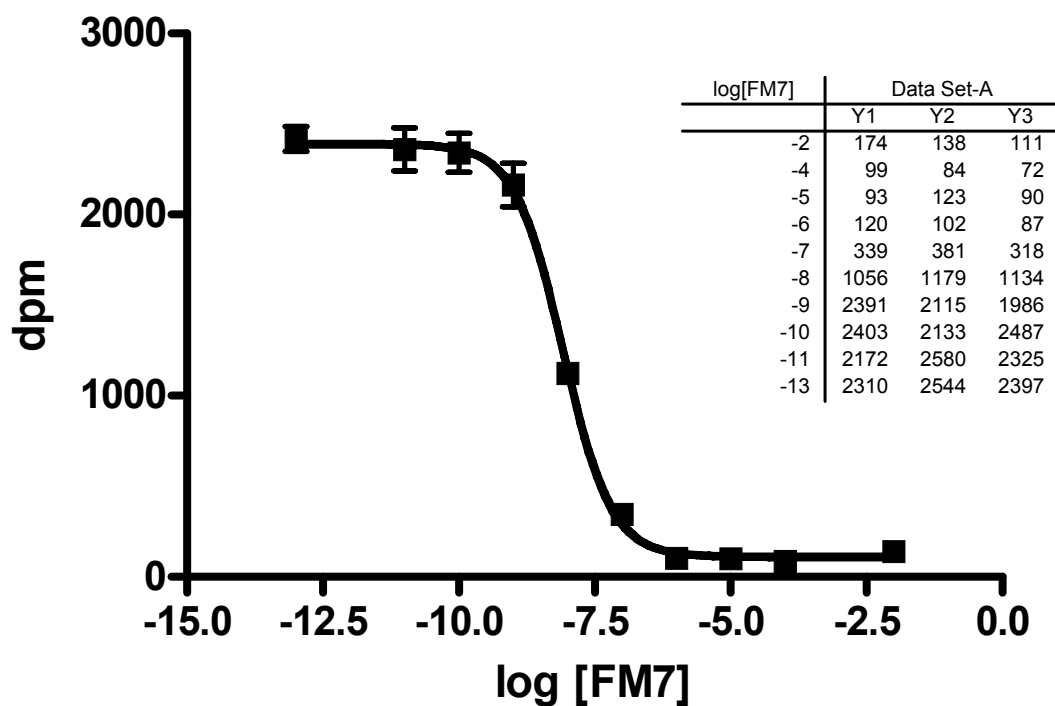
Zelllinie	eingesetzte Radioligandenkonzentration [nM]	gebundener Radioligand [%] MW \pm SEM	
HEK 5-HT _{2A}	~0,25	6,68 \pm 1,87	(n = 5)
HEK D _{2L}	~0,25	7,02 \pm 2,27	(n = 5)
HEK D ₃	~0,25	6,64 \pm 2,20	(n = 3)
HEK D ₁	~0,15	10,32 \pm 0,89	(n = 4)
HEK D ₅	~0,25	7,67 \pm 1,22	(n = 5)
CHO D _{2L}	~0,25	4,50 \pm 1,25	(n = 5)
CHO D ₃	~0,15	7,79 \pm 1,46	(n = 5)
CHO D _{4.4}	~0,15	7,99 \pm 1,32	(n = 5)

Tabelle D-3 Anteil des gebunden Radioliganden an der Gesamtkonzentration, MW = Mittelwert, SEM = mittlere Abweichung vom Mittelwert (standard error of the mean), n = Anzahl betrachteter Experimente

D.1.4 Beispiel einer Bindungskurve am 5-HT_{2A} Rezeptor

Die Auswertung der Radioligandbindungsdaten wurde im Abschnitt C.2.2.3 beschrieben. In Abbildung D-1 ist ein Beispiel einer Bindungskurve dargestellt. Die Abbildung zeigt eine Inhibitionskurve der Verbindung FM7 am 5-HT_{2A} Rezeptor, deren Daten einmal mit der Funktion „one site competition“, welche eine Kurve mit einem Hill-Koeffizienten von $n_H = -1,0$ durch die Datenpunkte legt und zusätzlich unter Anwendung der Funktion „sigmoidal dose response“ mit variablem Anstieg ausgewertet wurden. Beide Funktionen ergeben einen K_i -Wert von 6,1nM und die Kurven überlagern sich vollständig. Die Funktion „sigmoidal dose response“ ergab einen Hill-Koeffizienten von $n_H = -0,96$.

Man kann also davon ausgehen, dass es sich um einen dem Massenwirkungsgesetz folgenden Bindungsmechanismus an einer einheitlichen Rezeptorpopulation handelt. Demnach kann die Gleichung von Cheng und Prusoff zur Berechnung des K_i -Wertes angewendet werden.



	Data Set-A		Data Set-A
Sigmoidal dose-response (variable slope)		One site competition	
Best-fit values		Best-fit values	
BOTTOM	109.4	BOTTOM	113.4
TOP	2392	TOP	2387
LOGEC50	-8.080	LOGEC50	-8.080
HILLSLOPE	-0.9630	EC50	8.3204e-009
EC50	8.3100e-009	KI	6.1412e-009
KI	6.1336e-009	Ligand (Constant)	0.3300
Ligand (Constant)	0.3300	Kd (Constant)	0.9300
Kd (Constant)	0.9300	Std. Error	
Std. Error		BOTTOM	29.04
BOTTOM	31.74	TOP	33.59
TOP	38.23	LOGEC50	0.04946
LOGEC50	0.05195	95% Confidence Intervals	
HILLSLOPE	0.1077	BOTTOM	53.80 to 173.0
95% Confidence Intervals		TOP	2318 to 2456
BOTTOM	44.20 to 174.7	LOGEC50	-8.181 to -7.978
TOP	2313 to 2470	EC50	6.5865e-009 to 1.0511e-008
LOGEC50	-8.187 to -7.974	KI	4.8615e-009 to 7.7579e-009
HILLSLOPE	-1.184 to -0.7416	Goodness of Fit	
EC50	6.4981e-009 to 1.0627e-008	Degrees of Freedom	27
KI	4.7962e-009 to 7.8438e-009	R²	0.9904
Goodness of Fit		Absolute Sum of Squares	306859
Degrees of Freedom	26	Sy.x	106.6
R²	0.9904	Data	
Absolute Sum of Squares	305607	Number of X values	10
Sy.x	108.4	Number of Y replicates	3
Data		Total number of values	30
Number of X values	10	Number of missing values	0
Number of Y replicates	3		
Total number of values	30		
Number of missing values	0		

Abbildung D-1 Beispiel von Bindungskurven der Verbindung FM7 am 5-HT_{2A} Rezeptor – Auswertungen mit der Funktion „one site competition“ (durchgezogene Kurve) und der Funktion „sigmoidal dose response“ mit variablem Anstieg (gestrichelt; nicht sichtbar, da sich die Kurven überlagern)

D.2 Etablierung des Calcium Assays an 5-HT_{2A} und D₃ Rezeptor exprimierenden Zelllinien

Die HEK D₃ und HEK 5-HT_{2A} Zelllinien ließen sich stabil mit dem Fluoreszenzfarbstoff anfärben. Es konnte bei beiden Zelllinien ein reproduzierbares, dosisabhängiges Calciumsignal nach Rezeptorstimulation durch einen Agonisten detektiert werden. Bei Experimenten mit Wildtypzellen wurde durch den verwendeten Agonisten kein Calciumsignal ausgelöst. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass das Calciumsignal nach agonistischer Stimulation der D₃ und 5-HT_{2A} Zellen rezeptorvermittelt ist. Die ermittelten EC₅₀-Werte sind Tabelle D-1 zu entnehmen. Es konnte ebenfalls an beiden Zelllinien eine dosisabhängige Hemmung des Calciumsignals nach Präinkubation der Zellsuspension mit verschiedenen Konzentrationen eines Antagonisten beobachtet werden. Abbildung D-3 zeigt eine solche Inhibitskurve am Beispiel des Neuroleptikums Clozapin, gemessen an 5-HT_{2A} Rezeptor exprimierenden HEK Zellen. Ein Beispiel einer Dosis-Wirkungs-Kurve des 5-HT_{2A} Rezeptor-Standardagonisten DOI ist in Abbildung D-2 dargestellt.

Die Untersuchungen an 5-HT_{2A} Zellen zur Senkung der Farbstoffkonzentration ergaben auch mit halbiertem Farbstoffmenge positive Ergebnisse. Da der Farbstoff recht preisintensiv ist, konnten die Kosten pro Experiment durch eine Reduktion der Farbstoffkonzentration deutlich gesenkt werden. Die geringere Belastung der Zellen durch eingeschleuste Farbstoffmoleküle wirkte sich auch günstig auf deren Reaktivität aus. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass die HEK D₃ Zellen sehr temperaturempfindlich sind, da nur mit sorgfältig temperierten Reagenzien zufriedenstellende Ergebnisse erzielt werden konnten.

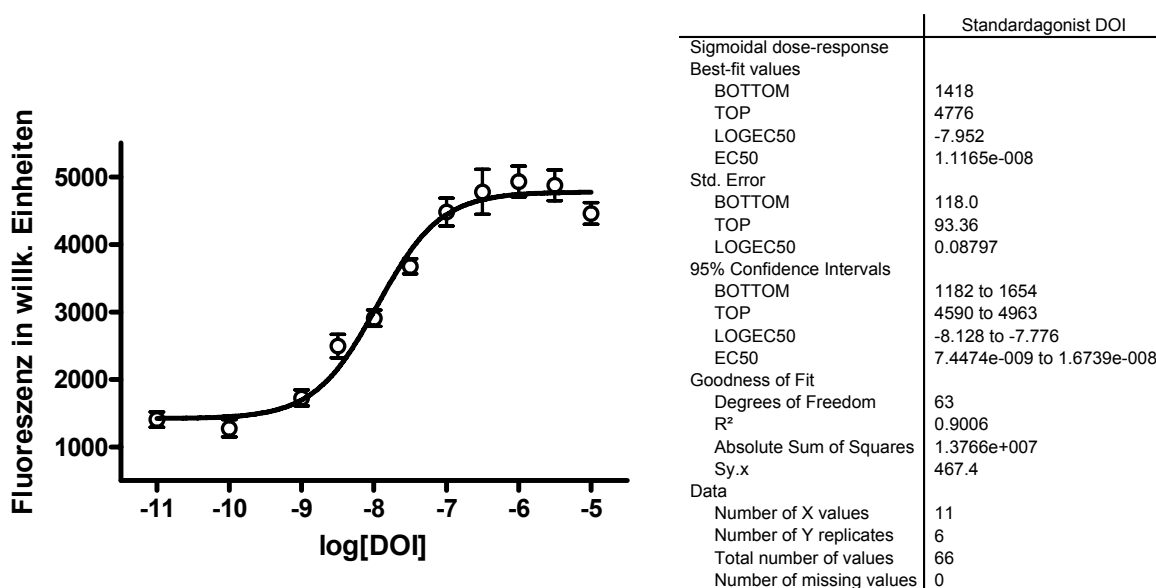
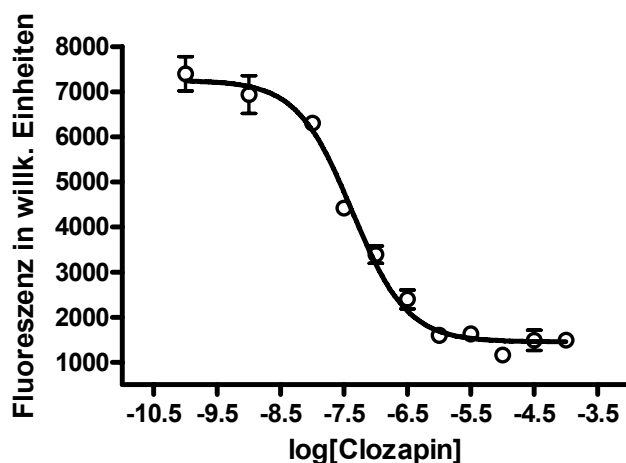


Abbildung D-2 Beispiel einer Dosis-Wirkungs-Kurve des Standardagonisten DOI an HEK5-HT_{2A} Zellen



Antagonist Clozapin	
One site competition	
Best-fit values	
BOTTOM	1451
TOP	7248
LOGEC50	-7.371
EC50	4.2528e-008
KI	1.7923e-009
Ligand (Constant)	100.0
Kd (Constant)	4.400
Std. Error	
BOTTOM	98.57
TOP	153.5
LOGEC50	0.05901
95% Confidence Intervals	
BOTTOM	1252 to 1650
TOP	6938 to 7558
LOGEC50	-7.491 to -7.252
EC50	3.2320e-008 to 5.5959e-008
KI	1.3622e-009 to 2.3584e-009
Goodness of Fit	
Degrees of Freedom	41
R ²	0.9663
Absolute Sum of Squares	7.9777e+006
Sy.x	441.1
Data	
Number of X values	11
Number of Y replicates	4
Total number of values	44
Number of missing values	0

Abbildung D-3 Beispiel einer Inhibitionskurve des Antagonisten Clozapin am Serotonin 5-HT_{2A} Rezeptor

Das funktionelle Calcium Assay unter Verwendung der HEK 5-HT_{2A}- und HEK D₃ Zelllinie wurde erfolgreich etabliert. Weitere funktionelle Experimente zur Vervollständigung der Aktivitätsdaten an 5-HT_{2A} und D₃ Rezeptoren werden derzeit durchgeführt.

D.3 Tabellarische Übersicht der ermittelten Bindungsdaten

D.3.1 Azecine und azecinverwandte Substanzen

Bei diesen Verbindungen handelt es sich größtenteils um bekannte Verbindungen aus dem Arbeitskreis, deren Bindungseigenschaften an einigen Dopaminrezeptorsubtypen bereits untersucht wurden (Literaturstellen siehe Tabelle C-6). Die Verbindungen wurden im Rahmen dieser Arbeit am Serotonin 5-HT_{2A} Rezeptor und auch an allen noch ausstehenden Dopaminrezeptorsubtypen vermessen. Nachfolgend sind alle verfügbaren Ergebnisse zusammengefasst.

Code (weitere Chiffren)	Struktur	Affinitäten aus Radioligandbindungsexperimenten						Ergebnisse des Calcium Assays			
		K _i -Wert [nM] MW ± SEM bzw. Senkung der gebunden Radioaktivität durch eine 10µM Lösung der Testsubstanz						Antagonist (AN): K _i -Wert [nM] Agonist (AG): EC ₅₀ -Wert [nM] MW ± SEM			
		5-HT _{2A}	D ₁	D ₅	D ₂	D ₃	D ₄	D ₁	D ₅	D ₂	D ₃
CE500 (LE-CE-500) (End1) (194)		1,58 ± 0,23	19,0 ± 2,30	45,6 ± 0,70	28,45 ± 6,04	1135 ± 273	92,6 ± 5,30	AN 83,6 ± 17,1	AN 37,3 ± 11,6	AN 0,46 ± 0,11	n.b.
CE501 (LE-CE-501) (End2) (195)		1,40 ± 0,27	3,70 ± 1,10	8,71 ± 0,42	109 ± 15,3	2071 ± 777	1830 ± 440	AN 17,8 ± 4,5	AN 16,4 ± 2,25	AN 14,0 ± 3,6	n.b.
CE510 (LE-CE-510) (162)		237 ± 68,5	597 ± 40,0	511 ± 103	1028 ± 461	<60%	7891	AN 1684	n.a.	n.a.	n.b.
CE520 (LE-CE-520) (163)		5,14 ± 1,60	29,5 ± 6,36	66,4 ± 4,64	24,4 ± 0,30	3136 ± 625	1488 ± 36,5	AN 222 ± 29,5	AN 48,1 ± 1,85	AN 25,0 ± 0,45	n.b.
CE521 (LE-CE-521) (164)		7,70 ± 1,57	14,0 ± 2,04	13,8 ± 6,57	522 ± 182	6120 ± 1802	962 ± 186	AN 39,1 ± 11,0	AN 11,7 ± 1,03	AN 353 ± 12,0	n.b.
CE522 (LE-CE-522) (165)		<60%	<60%	n.b.	<60%	<60%	<60%	n.a.	n.a.	n.a.	n.b.
CE523 (LE-CE-523) (168)		129 ± 2,50	393 ± 43,0	797 ± 82,5	857 ± 98,0	6897 ± 595	4257 ± 563	n.a.	n.a.	AN 668	n.b.
CE526 (LE-CE-526)		<60%	<60%	<60%	<60%	n.b.	<60%	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
CE527 (LE-CE-527) (167)		<60%	<60%	<60%	<60%	n.b.	<60%	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
CE530 (LE-CE-530) (169)		13,9 ± 2,00	136 ± 9,11	62,4 ± 9,45	112 ± 18,5	<60%	2764 ± 456	AN 251 ± 23,8	AN 298 ± 61,3	AN 432 ± 70,0	n.b.
CE531 (LE-CE-531) (170)		6,34 ± 0,63	59,6 ± 13,8	52,7 ± 3,64	33,0 ± 12,0	777 ± 154	1524	AN 622 ± 58,5	AN 118 ± 25,8	AN 36,9 ± 1,45	AN 7,7
CE541 (LE-CE-541) (171)		32,2 ± 10,4	125 ± 24,9	114 ± 31,6	11,5 ± 4,24	523 ± 81,5	28,1 ± 1,40	AN 98,1 ± 18,0	AN 212	AN 466	n.b.
CE542 (LE-CE-542) (172)		4966 ± 920	<60%	n.b.	<60%	<60%	<60%	AN 928 ± 23,5	AN 479 ± 136	AN 261 ± 13,5	n.b.
CE544 (LE-CE-544) (188)		3448 ± 511	<60%	n.b.	<60%	<60%	<60%	AN 1541 ± 190	n.a.	n.a.	n.b.
CE550 (LE-CE-550) (174)		0,36 ± 0,10	0,83 ± 0,06	0,10 ± 0,00	14,1 ± 2,75	475 ± 48,5	266 ± 22,0	AN 5,06 ± 2,49	AN 0,46 ± 0,20	AN 6,03 ± 1,95	AN 28,3

Code (weitere Chiffren)	Struktur	Affinitäten aus Radioligandbindungsexperimenten						Ergebnisse des Calcium Assays			
		K _i -Wert [nM] MW ± SEM bzw. Senkung der gebunden Radioaktivität durch eine 10µM Lösung der Testsubstanz						Antagonist (AN): K _i -Wert [nM] Agonist (AG): EC ₅₀ -Wert [nM] MW ± SEM			
		5-HT _{2A}	D ₁	D ₅	D ₂	D ₃	D ₄	D ₁	D ₅	D ₂	D ₃
CE551 (LE-CE-551) (175)		1,42 ± 0,25	0,56 ± 0,06	0,40 ± 0,13	45,2 ± 8,24	944 ± 171	268 ± 15,5	AN 1,69 ± 0,67	AN 0,33	AN 32,4	AN 12,8
CE560 (LE-CE-560) (179)		0,02 ± 0,01	2,15 ± 0,65	1,15 ± 0,56	14,2 ± 4,15	278 ± 75,5	134 ± 35,8	AN 1,60 ± 0,20	AN 2,85 ± 0,85	AN 1,26 ± 0,09	n.b.
CE562 (LE-CE-562) (180)		811 ± 61,6	<60%	3444 ± 1114	<60%	n.b.	<60%	n.a.	n.a.	n.a.	n.b.
CE566 (LE-CE-566) (181)		<60%	<60%	<60%	<60%	n.b.	<60%	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
CE570 (LE-CE-570) (183)		3,83 ± 0,71	14,5 ± 3,50	4,60 ± 1,40	87,0 ± 9,00	457	234 ± 32,5	AN 26,2 ± 11,9	AN 134 ± 2,5	AN 16,1 ± 4,75	AN 6,9
CE571 (LE-CE-571) (185)		0,56 ± 0,06	3,23 ± 1,71	13,6 ± 4,30	20,7 ± 4,30	100 ± 29,0	60,2 ± 29,8	AN 14,1 ± 0,1	AN 3,90 ± 0,33	AN 37,1 ± 5,00	AN 10,6
CE572 (LE-CE-572) (189)		736 ± 60,5	4160	3384 ± 464	<60%	<60%	<60%	AN 1650	n.a.	n.a.	n.b.
CE576 (LE-CE-576) (182)		<60%	<60%	<60%	<60%	n.b.	<60%	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
CE577 (LE-CE-577) (184)		<60%	<60%	<60%	<60%	n.b.	<60%	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
CE580 (LE-CE-580) (187)		4,15 ± 0,69	128 ± 48,0	80,9 ± 10,7	52,5 ± 11,5	356 ± 59,0	593 ± 11,0	AN 465	AN 71,7 ± 6,55	AN 52,8	AN 56,0
CE582 (LE-CE-582) (190)		<60%	<60%	<60%	<60%	<60%	<60%	n.a.	n.a.	n.a.	n.b.
CE586 (LE-CE-586) (186)		<60%	<60%	<60%	<60%	n.b.	<60%	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
CE590 (LE-CE-590) (191)		22,0 ± 4,60	23,5 ± 11,7	30,9 ± 1,30	172 ± 5,00	1343 ± 281	2869 ± 199	AN 117 ± 38,6	AN 169 ± 17,0	AN 107 ± 25,5	n.b.
CE591 (LE-CE-591) (192)		118 ± 42,0	80,1 ± 48,0	50,7 ± 7,65	383 ± 7,50	3069 ± 189	650	AN 345 ± 7,5	AN 213 ± 40,5	AN 25,8 ± 2,85	n.b.
CE592 (LE-CE-592) (193)		<60%	<60%	<60%	<60%	<60%	<60%	n.a.	n.a.	n.a.	n.b.

Code (weitere Chiffren)	Struktur	Affinitäten aus Radioligandbindungsexperimenten						Ergebnisse des Calcium Assays			
		K _i -Wert [nM] MW ± SEM bzw. Senkung der gebundenen Radioaktivität durch eine 10µM Lösung der Testsubstanz						Antagonist (AN): K _i -Wert [nM] Agonist (AG): EC ₅₀ -Wert [nM] MW ± SEM			
		5-HT _{2A}	D ₁	D ₅	D ₂	D ₃	D ₄	D ₁	D ₅	D ₂	D ₃
CE5A0 (MM75Me) (279)		4383 ± 45,5	1265 ± 166	<60%	<60%	<60%	<60%	n.a.	n.a.	n.a.	n.b.
CE5A1 (280)		<60%	2071 ± 76,5	1811 ± 478	<60%	<60%	<60%	AN 176	AN 114	n.b.	n.b.
FM5 (266)		3762 ± 724	<60%	<60%	<60%	<60%	<60%	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
FM7 (267)		6,11 ± 0,03	30,9 ± 1,07	5,68 ± 1,84	2,15 ± 0,04	125 ± 24,0	1661 ± 554	n.b.	AN 38,5 ± 10,5	n.b.	AN 79
FS3 (LE-PM-456) (160)		12,9 ± 2,04	49,0 ± 8,65	57,0 ± 33,0	698 ± 70,0	1698 ± 297	1068	AN 55,2 ± 8,55	AN 59,8 ± 21,7	AN 62,9 ± 24,5	n.b.
LE300 (LE-RU-300) (34)		0,13 ± 0,01	2,98 ± 0,61	1,18 ± 0,40	9,14 ± 6,89	40,4 ± 14,5	41,5 ± 4,45	AN 7,36 ± 3,43	n.b.	n.b.	n.b.
LE301 (LE-RU-301) (35)		0,29 ± 0,08	28,0	11,5 ± 3,20	253 ± 46,0	324 ± 85,5	379 ± 5,50	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
LE404 (LE-404) (44)		0,67 ± 0,04	0,39 ± 0,16	1,50 ± 0,00	17,5 ± 1,50	47,5 ± 16,3	7,63 ± 3,68	AN 1,35 ± 0,25	n.b.	n.b.	n.b.
LE410 (LE-410) (43)		3,42 ± 0,45	4,50 ± 2,90	11,2 ± 1,80	56,5 ± 12,5	52,0 ± 6,00	148 ± 22,0	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
LE441 (LE-RU-441) (TW64) (394)		n.b.	23,5 ± 6,09	10,64 ± 4,61	93,8 ± 30,3	2423 ± 92,0	55,7 ± 3,35	AN 54,5 ± 0,5	AN 32,7 ± 7,2	AN 33,5 ± 12,5	
MI506 (LE-MI-506) (202)		72,4 ± 12,9	8,90 ± 2,10	23,3 ± 8,50	102 ± 13,8	748	328	n.b.	n.b.	AN 289	n.b.
PM20 (LE-PM-425) (128)		4,42 ± 1,27	23,4 ± 5,15	54,0 ± 20,5	13,0 ± 9,00	75,7 ± 7,30	43,4 ± 13,3	AN 24,1 ± 3,90	AN 7,19 ± 2,54	AN 0,55 ± 0,17	n.b.
PM22-3 (LE-PM-433) (136)		350 ± 26,5	4378 ± 538	3164 ± 228	5267 ± 589	<60%	<60%	n.a.	n.a.	n.a.	n.b.
PM22b (LE-PM-432) (135)		1496 ± 89,0	2853 ± 514	1065	7810 ± 391	<60%	<60%	n.a.	n.a.	n.a.	n.b.

Code (weitere Chiffren)	Struktur	Affinitäten aus Radioligandbindungsexperimenten						Ergebnisse des Calcium Assays			
		K _i -Wert [nM] MW ± SEM bzw. Senkung der gebunden Radioaktivität durch eine 10µM Lösung der Testsubstanz						Antagonist (AN): K _i -Wert [nM] Agonist (AG): EC ₅₀ -Wert [nM] MW ± SEM			
		5-HT _{2A}	D ₁	D ₅	D ₂	D ₃	D ₄	D ₁	D ₅	D ₂	D ₃
PM40 (LE-PM-429) (132)		23,1 ± 0,15	82,0	22,9	62,0 ± 5,00	151 ± 57,5	5987 ± 675	AN 567 ± 70,0	AN 1051 ± 309	AN 21,2 ± 2,45	n.b.
PM53 (LE-PM-427) (130)		8,55 ± 0,28	33,0 ± 2,00	11,3 ± 3,07	11,7 ± 1,30	85,1 ± 33,9	751	AN 281 ± 4,00	AN 266 ± 42,0	AN 3,67 ± 0,73	n.b.
PM58 (LE-PM-434) (137)		15,2 ± 4,53	25,3 ± 3,82	19,0	287 ± 9,50	415 ± 138	339 ± 6,50	AN 61,3 ± 0,25	AN 13,7 ± 0,83	AN 3,67 ± 0,73	n.b.
PM65a (LE-PM-435) (138)		84,4 ± 5,05	237 ± 29,5	1419	263 ± 28,0	<60% <60%		n.a.	n.a.	n.b.	n.b.
PM77 (LE-PM-428) (131)		1,51 ± 0,58	8,92 ± 0,82	51,7 ± 15,6	53,0 ± 1,00	296 ± 60,0	913 ± 79,0	AN 76,5 ± 16,5	AN 63,2	AN 2,55 ± 0,55	n.b.
PM78 (LE-PM-426) (129)		7,26 ± 0,71	3,80 ± 0,80	7,10 ± 2,40	80,5 ± 20,6	141 ± 4,50	58,6	AN 10,7 ± 0,7	AN 6,63 ± 1,03	AN 30,0 ± 5,3	n.b.
PM83 (LE-PM-436) (139)		1,17 ± 0,13	0,83 ± 0,11	0,11 ± 0,01	4,00 ± 1,90	24,6 ± 4,29	4,69 ± 0,49	AN 0,64 ± 0,18	AN 0,05 ± 0,02	AN 3,45 ± 1,25	n.b.
PM92 (LE-PM-437) (141)		17,7 ± 6,60	41,0 ± 7,00	8,86	447 ± 33,5	121 ± 6,50	275 ± 27,5	AN 431	AN 150	AN 46,8	n.b.
PM98 (LE-PM-443) (147)		68,2 ± 13,7	9,30 ± 3,30	227 ± 75,5	37,3 ± 10,8	1187 ± 43,0	6198	AN 30,3	AN 39,5 ± 11,2	AN 251	n.b.
PM103 (LE-PM-440) (144)		116 ± 20,3	61,4 ± 0,35	n.b.	389 ± 19,5	3271 ± 826	2533 ± 118	AN 127	AN 44,3 ± 16,1	AN 336 ± 52,2	n.b.
PM124 (LE-PM-442) (146)		3,02 ± 1,91	3,20 ± 0,60	1,90	88,0 ± 21,0	273 ± 115	258 ± 90,0	AN 3,79 ± 1,06	AN 1,36 ± 0,58	AN 37,5 ± 12,0	n.b.
PM126 (LE-PM-444) (148)		428 ± 68,5	365 ± 26,5	376 ± 75,5	2460 ± 1631	6910 ± 708	282 ± 50,5	AN 917 ± 76,5	AN 1074	AN 550	n.b.
PM127 (LE-PM-445) (149)		5045 ± 773	<60% <60%	<60% <60%	n.b.	2554 ± 1390	626 ± 217	AN 798	AN 901	AN 95,5	n.b.
PM130 (LE-PM-446) (150)		22,8 ± 2,05	18,9 ± 1,10	22,6 ± 0,05	65,45 ± 6,55	<60% <60%	7808 ± 1184	AN 34,3 ± 1,15	AN 92,9	AN 105 ± 43,1	n.b.
PM145 (LE-PM-448) (152)		6,57 ± 1,36	7,55 ± 1,45	11,5 ± 3,63	164 ± 12,0	1833 ± 292	390 ± 106	AN 37,6 ± 1,2	AN 87,8	AN 17,4 ± 1,65	n.b.

Code (weitere Chiffren)	Struktur	Affinitäten aus Radioligandbindungsexperimenten						Ergebnisse des Calcium Assays			
		K _i -Wert [nM] MW ± SEM bzw. Senkung der gebunden Radioaktivität durch eine 10µM Lösung der Testsubstanz						Antagonist (AN): K _i -Wert [nM] Agonist (AG): EC ₅₀ -Wert [nM] MW ± SEM			
		5-HT _{2A}	D ₁	D ₅	D ₂	D ₃	D ₄	D ₁	D ₅	D ₂	D ₃
PM147 (LE-PM-452) (156)		0,64 ± 0,28	0,46 ± 0,16	1,81	0,99 ± 0,02	1,88 ± 0,28	24,8 ± 9,65	AN 4,01 ± 0,33	AN 1,58 ± 0,46	AN 0,13 ± 0,05	n.b.
PM148 (LE-PM-449) (153)		5,14 ± 0,09	8,70 ± 2,00	4,69	84,1 ± 2,75	215 ± 84,0	202 ± 73,5	AN 64,1 ± 19,5	AN 10,44 ± 3,57	AN 7,9 ± 0,3	n.b.
PM153 (LE-PM-451) (155)		4,25 ± 0,17	2,03 ± 0,91	1,68 ± 0,60	58,7 ± 9,35	342 ± 98,5	90,0 ± 24,0	AN 3,22 ± 0,15	AN 0,76 ± 0,06	AN 19,1 ± 7,63	n.b.
PM154 (LE-PM-453) (157)		0,69 ± 0,08	9,40 ± 1,00	22,4	6,45 ± 0,15	102 ± 4,50	106 ± 24,8	AN 26,9 ± 11,4	AN 7,18 ± 1,48	AN 0,62 ± 0,23	n.b.
PM155 (LE-PM-454) (158)		0,54 ± 0,19	3,07 ± 1,29	4,72 ± 1,71	1,95 ± 0,45	27,7 ± 12,2	54,0 ± 9,82	AN 8,6	AN 3,11 ± 0,68	AN 4,77 ± 2,54	n.b.
SM (200)		0,02 ± 0,005	2,00 ± 1,60	0,19 ± 0,05	1,80 ± 0,40	5,16 ± 0,05	21,6 ± 3,55	AN 0,19 ± 0,05	AN 0,14 ± 0,03	AN 0,32 ± 0,13	n.b.
WW33 (LE-WW-454) (117)		110 ± 8,50	379 ± 157	n.b.	<60%	1818	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
WW60 (LE-WW-450) (113)		6,52 ± 1,60	35,5 ± 11,7	1,80 ± 0,20	158 ± 38,0	1601 ± 306	546 ± 110	AN 27,4	AN 19,4	AN 14,0	n.b.
WW84 (LE-WW-451) (114)		3,24 ± 0,83	3,20 ± 0,80	0,57 ± 0,10	274 ± 0,50	1384 ± 454	375 ± 106	AN 7,33	AN 4,52 ± 1,92	AN 159	n.b.

Tabelle D-4 Bindungsdaten der Azecine und verwandter Verbindungen aus Radioligandbindungsstudien und Calcium-Fluoreszenz-Experimenten; MW = Mittelwert aus mindestens zwei Experimenten; SEM = standard error of the mean (mittlere Abweichung vom Mittelwert); AN = Antagonist; AG = Agonist; n.b. = nicht bestimmt; n.a. = nicht aktiv (bis zu 100µM Lösungen der Testsubstanz bewirkten keine Abnahme des agonistenvermittelten Fluoreszenzsignals); <60% = eine 10µM Lösung der Testsubstanz senkte die gebundene Radioaktivität um weniger als 60%, ein K_i-Wert wurde nicht bestimmt

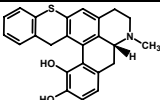
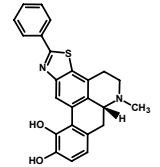
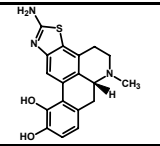
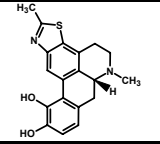
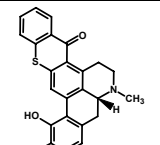
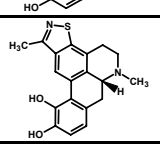
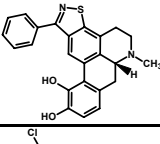
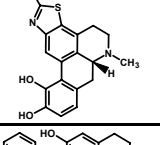
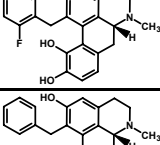
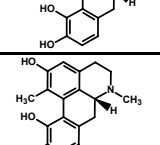
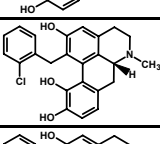
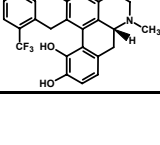

D.3.2 Alkylpiperazinderivate

Code (weitere Chiffren)	Struktur	Affinitäten aus Radioligandbindungsexperimenten						Ergebnisse des Calcium Assays			
		K _i -Wert [nM] MW ± SEM bzw. Senkung der gebundenen Radioaktivität durch eine 10µM Lösung der Testsubstanz						Antagonist (AN): K _i -Wert [nM] Agonist (AG): EC ₅₀ -Wert [nM] MW ± SEM			
		5-HT _{2A}	D ₁	D ₅	D ₂	D ₃	D ₄	D ₁	D ₅	D ₂	D ₃
AD6 (226)		<60%	<60%	<60%	<60%	<60%	<60%	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
AD10b (227)		<60%	<60%	<60%	<60%	<60%	<60%	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
AD12 (228)		<60%	<60%	<60%	<60%	<60%	94,0 ± 15,0	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
AD15 (229)		<60%	<60%	<60%	<60%	<60%	8778 ± 1224	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
AD24 (230)		<60%	569 ± 198	<60%	203 ± 4,50	14,1 ± 4,94	202 ± 51,5	AN 347	n.b.	n.a.	n.b.
AD25 (231)		151 ± 61,7	718 ± 69,0	358 ± 34,0	243 ± 9,00	79,5 ± 2,05	152 ± 8,00	AN 279	n.b.	AN 19,9	n.b.
AD27 (232)		<60%	200 ± 33,8	460 ± 58,5	537 ± 23,5	68,7 ± 5,80	912 ± 35,5	n.a.	n.b.	n.a.	n.b.
AD29 (233)		168 ± 62,3	146 ± 30,0	224 ± 20,0	411 ± 70,0	126 ± 7,00	226 ± 47,5	AN 687	n.b.	n.a.	n.b.
AD30 (235)		<60%	<60%	<60%	<60%	<60%	159 ± 54,5	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
AD31 (234)		99,3 ± 18,7	1438 ± 115	961 ± 242	952 ± 117	123 ± 0,50	245 ± 61,6	AN 89	n.b.	AN 420	n.b.
AD34 (236)		<60%	<60%	<60%	<60%	<60%	3796	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
AHA-F5 (203)		1041 ± 88,5	1596 ± 52,0	1629 ± 216	38,2 ± 1,80	65,6 ± 4,00	178 ± 22,5	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
AHA-F6 (204)		109 ± 5,00	586 ± 189	230 ± 15,0	177 ± 57,5	287 ± 42,5	35,6 ± 9,29	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
AHA-F7 (205)		243 ± 69,5	815 ± 197	273 ± 74,9	113 ± 11,0	149 ± 65,9	<60%	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
AHA-F8 (206)		275 ± 30,0	1271 ± 138	1132 ± 30,0	360 ± 30,5	187 ± 33,0	78,8 ± 18,3	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.

Code (weitere Chiffren)	Struktur	Affinitäten aus Radioligandbindungsexperimenten						Ergebnisse des Calcium Assays			
		K _i -Wert [nM] MW ± SEM bzw. Senkung der gebundenen Radioaktivität durch eine 10µM Lösung der Testsubstanz						Antagonist (AN): K _i -Wert [nM] Agonist (AG): EC ₅₀ -Wert [nM] MW ± SEM			
		5-HT _{2A}	D ₁	D ₅	D ₂	D ₃	D ₄	D ₁	D ₅	D ₂	D ₃
AHA-F13 (211)		<60%	<60%	<60%	41,2 ± 6,80	527 ± 227	81,2 ± 25,8	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
AHA-F14 (212)		186 ± 17,5	<60%	507 ± 55,6	140 ± 71,5	1780 ± 161	158 ± 29,3	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
AHA-F15 (213)		504 ± 123	1634 ± 51,0	1703 ± 44,0	72,7 ± 8,65	102 ± 13,3	185 ± 56,8	AN 576	n.b.	n.b.	n.b.
AHA-F16 (214)		280 ± 36,5	1971 ± 763	<60%	184 ± 14,0	306 ± 8,50	91,7 ± 21,1	AN 8412	n.b.	n.b.	n.b.
AHA-F17 (215)		757 ± 0,50	482 ± 53,0	313 ± 47,0	162 ± 13,5	79,5 ± 26,5	4,20 ± 1,80	AN 2007	n.b.	n.b.	n.b.
AHA-F18 (216)		294 ± 34,5	744 ± 187	202 ± 95,0	1747 ± 118	1204 ± 384	23,9 ± 5,80	AN 179	n.b.	n.b.	n.b.
AHA-F19 (217)		213 ± 37,0	361 ± 34,5	190 ± 5,00	323 ± 19,5	247 ± 42,7	28,4 ± 13,3	AN 195	n.b.	n.b.	n.b.
AHA-F20 (218)		314 ± 56,5	632 ± 128	330 ± 35,5	405 ± 91,0	195 ± 29,5	9,55 ± 0,85	AN 322	n.b.	n.b.	n.b.
AHA-F21 (219)		6939 ± 252	183 ± 91,5	80,2 ± 7,20	189 ± 41,8	36,0 ± 6,50	216 ± 56,0	AN 66,9	n.b.	n.b.	n.b.
AHA-F22 (220)		467 ± 61,5	123 ± 15,0	33,6 ± 2,80	760 ± 118	660 ± 150	142 ± 18,0	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
AHA-F23 (221)		654 ± 14,5	507 ± 32,0	80,8 ± 5,00	387 ± 1,50	13,6 ± 3,22	462 ± 67,5	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
AHA-F24 (222)		n.b.	n.b.	75,4 ± 21,2	319	30,1 ± 17,4	134 ± 21,5	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.

Tabelle D-5 Bindungsdaten der Alkylpiperazine aus Radioligandbindungsstudien und Calcium-Fluoreszenz-Experimenten; MW = Mittelwert aus mindestens zwei Experimenten; SEM = standard error of the mean (mittlere Abweichung vom Mittelwert); AN = Antagonist; AG = Agonist; n.b. = nicht bestimmt; n.a. = nicht aktiv (bis zu 100µM Lösungen der Testsubstanz bewirkten keine Abnahme des agonistenvermittelten Fluoreszenzsignals); <60% = eine 10µM Lösung der Testsubstanz senkte die gebundene Radioaktivität um weniger als 60%, ein K_i-Wert wurde nicht bestimmt

D.3.3 Apomorphinderivate

Code (weitere Chiffren)	Struktur	Affinitäten aus Radioligandbindungsexperimenten						Ergebnisse des Calcium Assays			
		K _i -Wert [nM] MW ± SEM bzw. Senkung der gebunden Radioaktivität durch eine 10µM Lösung der Testsubstanz						Antagonist (AN): K _i -Wert [nM] Agonist (AG): EC ₅₀ -Wert [nM] MW ± SEM			
		5-HT _{2A}	D ₁	D ₅	D ₂	D ₃	D ₄	D ₁	D ₅	D ₂	D ₃
AM1 (246)		4811 ± 325	3237 ± 171	<60%	2096 ± 886	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
AM2 (247)		1725 ± 372	1812 ± 48,5	219 ± 40,5	3212 ± 886	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
AM3 (248)		1407 ± 396	2113 ± 203	231 ± 3,50	904 ± 187	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
AM4 (249)		2825 ± 225	2753 ± 61,0	592 ± 123	3561 ± 631	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
AM5 (250)		779 ± 274	252 ± 29,5	70,6 ± 5,44	1167 ± 277	1152 ± 630	7443 ± 1184	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
AM6 (251)		52,4 ± 10,0	1027 ± 137	309 ± 71,0	89,6 ± 16,3	<60%	1142 ± 603	AG 78,2 ± 15,4	n.b.	AG 124	n.b.
AM7 (252)		1731 ± 22,0	<60%	<60%	6810 ± 955	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
AM8 (253)		2471 ± 289	<60%	<60%	<60%	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
AM1a (254)		262 ± 25,0	102 ± 32,0	53,4 ± 19,1	56,4 ± 9,20	n.b.	n.b.	AG 19,8	AG 1,05	n.b.	AG 11,0
AM2a (255)		336 ± 35,0	83,4 ± 33,6	49,5 ± 9,00	166 ± 4,00	n.b.	n.b.	AG 8,81	AG 1,60	n.b.	n.b.
AM3a (256)		246 ± 12,5	1434 ± 164	569 ± 35,0	387 ± 50,4	n.b.	n.b.	AG 346	AG 26,9	n.b.	n.b.
AM4a (257)		233 ± 0,50	243 ± 35,5	117 ± 37,8	106 ± 26,4	n.b.	n.b.	AG 441	n.b.	n.b.	n.b.
AM5a (258)		253 ± 42,5	236 ± 72,5	208 ± 48,0	312 ± 75,5	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.

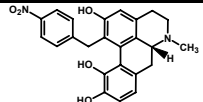
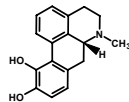
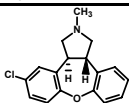
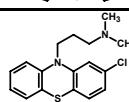
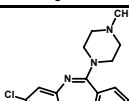
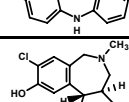
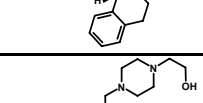
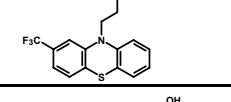
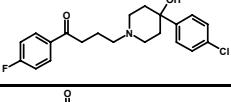
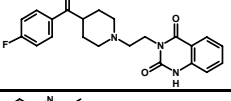
Code (weitere Chiffren)	Struktur	Affinitäten aus Radioligandbindungsexperimenten						Ergebnisse des Calcium Assays			
		K _i -Wert [nM] MW ± SEM bzw. Senkung der gebunden Radioaktivität durch eine 10µM Lösung der Testsubstanz						Antagonist (AN): K _i -Wert [nM] Agonist (AG): EC ₅₀ -Wert [nM] MW ± SEM			
		5-HT _{2A}	D ₁	D ₅	D ₂	D ₃	D ₄	D ₁	D ₅	D ₂	D ₃
AM6a (259)		<60%	<60%	<60%	<60%	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.

Tabelle D-6 Bindungsdaten von Apomorphinderivaten aus Radioligandbindungsstudien und Calcium-Fluoreszenz-Experimenten; MW = Mittelwert aus mindestens zwei Experimenten; SEM = standard error of the mean (mittlere Abweichung vom Mittelwert); AN = Antagonist; AG = Agonist; n.b. = nicht bestimmt; n.a. = nicht aktiv (bis zu 100µM Lösungen der Testsubstanz bewirkten keine Abnahme des agonistenvermittelten Fluoreszenzsignals); <60% = eine 10µM Lösung der Testsubstanz senkte die gebundene Radioaktivität um weniger als 60%, ein K_i-Wert wurde nicht bestimmt

D.3.4 Referenzsubstanzen

Code (weitere Chiffren)	Struktur	Affinitäten aus Radioligandbindungsexperimenten						Ergebnisse des Calcium Assays			
		K _i -Wert [nM] MW ± SEM bzw. Senkung der gebunden Radioaktivität durch eine 10µM Lösung der Testsubstanz						Antagonist (AN): K _i -Wert [nM] Agonist (AG): EC ₅₀ -Wert [nM] MW ± SEM			
		5-HT _{2A}	D ₁	D ₅	D ₂	D ₃	D ₄	D ₁	D ₅	D ₂	D ₃
Apomorphin (AM1b) (451)		257 ± 27,5	157 ± 22,8	49,1 ± 7,90	n.b.	56,6 ± 21,3	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Asenapin (535)		5,88 ± 0,17	n.b.	2,28 ± 0,15	13,8	3,24 ± 1,11	8,74	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Chlorpromazin (387)		5,24 ± 0,66	25,7 ± 3,00	n.b.	0,67 ± 0,29	1,57 ± 0,97	11,4 ± 5,85	AN 92,0	AN 1024	AN 178	n.b.
Clozapin (463)		3,20 ± 1,32	n.b.	13,8 ± 5,94	320	315 ± 48,5	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Ecopipam (SCH-39166) (534)		507	n.b.	0,70 ± 0,24	<60%	2035 ± 733	9389	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Fluphenazin (389)		67,2	0,95 ± 0,42	0,82 ± 0,10	0,39 ± 0,18	2,76 ± 1,71	45,6 ± 2,70	AN 41,4	AN 23,4	AN 0,06 ± 0,02	n.b.
Haloperidol (390)		104 ± 21,3	3,93 ± 1,75	4,17 ± 0,32	0,28 ± 0,26	0,18 ± 0,03	3,53 ± 0,89	AN 38,2	AN 17,2	AN 8,7 ± 5,00	AN 5,00
Ketanserin (462)		2,64 ± 0,30	n.b.	64,3 ± 24,2	n.b.	1368	17,3	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Risperidon (536)		11,0 ± 0,20	n.b.	8,04 ± 1,85	12,6	9,59	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.

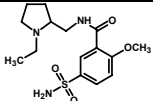
Code (weitere Chiffren)	Struktur	Affinitäten aus Radioligandbindungsexperimenten						Ergebnisse des Calcium Assays			
		K _i -Wert [nM] MW ± SEM bzw. Senkung der gebundenen Radioaktivität durch eine 10µM Lösung der Testsubstanz						Antagonist (AN): K _i -Wert [nM] Agonist (AG): EC ₅₀ -Wert [nM] MW ± SEM			
		5-HT _{2A}	D ₁	D ₅	D ₂	D ₃	D ₄	D ₁	D ₅	D ₂	D ₃
Supirid (464)		<60%	<60%	n.b.	780	736 ± 42,0	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.

Tabelle D-7 Bindungsdaten verschiedener bekannter Verbindungen aus Radioligandbindungsstudien und Calcium-Fluoreszenz-Experimenten (Verbindungen in alphabetischer Reihenfolge); MW = Mittelwert aus mindestens zwei Experimenten; SEM = standard error of the mean (mittlere Abweichung vom Mittelwert); AN = Antagonist; AG = Agonist; n.b. = nicht bestimmt; n.a. = nicht aktiv (bis zu 100µM Lösungen der Testsubstanz bewirkten keine Abnahme des agonistenvermittelten Fluoreszenzsignals); <60% = eine 10µM Lösung der Testsubstanz senkte die gebundene Radioaktivität um weniger als 60%, ein K_i-Wert wurde nicht bestimmt

D.4 Diskussion der Bindungsdaten

Die durch Radioligandbindungsexperimente gewonnenen Affinitätsdaten sollen zur Diskussion von Struktur-Wirkungs-Beziehungen dienen.

Um die Zusammenhänge zwischen Struktur und Wirkung besser erkennen zu können, werden die Ergebnisse der Radioligandbindungsstudien im Folgenden teilweise in Diagrammen dargestellt. Da K_i -Werte einen Punkt und keinen Bereich darstellen (wie zum Beispiel prozentuale Verdrängung eines Liganden) wäre es korrekt, sie im Diagramm als Punkte darzustellen. Das ergibt allerdings bei bis zu sechs verschiedenen Rezeptoraffinitäten pro Substanz ein sehr unübersichtliches Bild. Deswegen wurden Balkendiagramme gewählt. Die Balken sind nach Substanzen gruppiert und stellen innerhalb der Gruppe jeweils von links nach rechts die Werte für den 5-HT_{2A} Rezeptor (gelb), die Rezeptoren der D₁ Familie (D₁ hellrot, D₅ dunkelrot) und die der D₂ Familie (D₂ mittelblau, D₃ hellblau D₄ dunkelblau) dar. Werden subnanomolare bis mikromolare K_i -Werte in einem Diagramm aufgetragen, sind unterschiedliche Affinitäten im unteren Konzentrationsbereich kaum zu beurteilen. Aus diesem Grund wird für die graphische Darstellung der negative dekadische Logarithmus der K_i -Werte (pK_i -Wert) verwendet. Je größer der Balken im Diagramm ist, umso affiner ist die Substanz am jeweiligen Rezeptor bzw. desto kleiner ist der entsprechende K_i -Wert.

D.4.1 Azecine und deren Homologe

Für die Testung an 5-HT_{2A} Rezeptoren wurden hauptsächlich solche Substanzen ausgewählt, die bereits in Dopaminexperimenten Affinitäten zeigten. Dabei handelt es sich größtenteils um Verbindungen vom Diarylazecin-, -undecan- und -dodecan-Typ, in denen ein gesättigter 10-, 11- oder 12-gliedriger Stickstoffheterocyclus zwei aromatische Systeme verbindet, wobei die Aromaten durch eine Methylengruppe voneinander getrennt sind. Außerdem wurden einige ringoffene und damit flexiblere Verbindungen, sowie Chinolizin- und Homochinolizinvorstufen mit geschlossener, zentraler C-N-Bindung und auch einige quartäre Salze mit methyliertem cycloaliphatischen Stickstoff untersucht.

In früheren Arbeiten, die sich mit der Substanzklasse der Azecine beschäftigten, wurden für die Affinitäten an Dopaminrezeptoren folgende Struktur-Wirkungs-Beziehungen aufgestellt:

- *N*-methylierte Verbindungen besitzen die höchsten Affinitäten, Entfernen oder Vergrößern des Substituenten am Stickstoff verringert die Affinität der Verbindungen [Decker, 2001; Decker, Lehmann, 2003; Mohr, 2005]
- Am Aromaten hydroxylierte Dibenzoderivate zeigen besonders am D₁ Rezeptor höhere Affinitäten als die methoxylierten Verbindungen [Mohr, 2005; Hoefgen et al., 2006].
- Bei Benzindoloderivaten führt eine Hydroxy- bzw. Methoxysubstitution an Position 11 (Indol) zu einer Affinitätssteigerung gegenüber der Leitstruktur LE300. Zwischen dem

11-Methoxy- und dem 11-Hydroxyderivat bestehen keine Affinitätsunterschiede [Enzensperger, 2007; Enzensperger et al., 2007b].

- Analog zu den Dibenzoderivaten ist das in 3-Position (Benzol) hydroxysubstituierte Benzindoloderivat dem 3-Methoxyderivat, besonders hinsichtlich der D₁ Affinität, überlegen [Enzensperger, 2007; Enzensperger et al., 2007a].
- 3-Substituierte Dibenzazecine sind in ihrer Affinität den 1- und 2-substituierten Derivaten überlegen, besonders 3-Hydroxylierung steigert die Affinität [Mohr, 2005; Hoefgen et al., 2006].
- Monomethoxylierte Dibenzderivate sind in ihren Affinitäten den dimethoxylierten Derivaten überlegen, dabei ist die Substitution in 2-Stellung gegenüber der 3-Substitution von Vorteil [Hoefgen et al., 2006].
- Sowohl bei Dibenz- als auch bei Benzindoloderivaten wird eine Vergrößerung des zentralen Ringes zum 11-Ring toleriert, wobei sich die Isomere der asymmetrischen 11-Ringderivate stark in ihren Affinitäten unterscheiden [Enzensperger, 2007; Enzensperger et al., 2007b].
- Vergrößerung des zentralen Rings der Dibenzverbindungen zum 12-Ring verringert die Affinität deutlich [Enzensperger, 2007; Enzensperger et al., 2007b].
- „Verschiebung“ des cycloalipatischen Stickstoffs im 10-Ring führt zu drastischem Wirkungsverlust [Enzensperger, 2007; Schulze et al., 2009].
- Chlorierung in 1-Position steigert die Affinitäten 2-hydroxylierter Dibenzazecine mehr, als Chlorierung in 3-Position [Mohr, 2005; Mohr et al., 2006].
- Substituenten in 2-Stellung senken die Affinität 3-hydroxylierter Dibenzoderivate [Mohr, 2005; Mohr et al., 2006].

Diese bekannten Struktur-Wirkungs-Beziehungen an Dopaminrezeptoren sollten nun unter Einbeziehung des 5-HT_{2A} Rezeptors betrachtet und ergänzt werden.

Auf der folgenden Doppelseite sind die Affinitätsprofile der Dibenz-, Benzindolo- und Bisindoloazecine und deren Homologen am 5-HT_{2A} Rezeptor und den Dopaminrezeptorsubtypen, in der Reihenfolge absteigender 5-HT_{2A} Affinität, graphisch dargestellt. Die zugehörigen K_i-Werte sind der daran anschließenden Tabelle D-8 zu entnehmen, welche die Verbindungen in der entsprechenden Reihenfolge enthält.

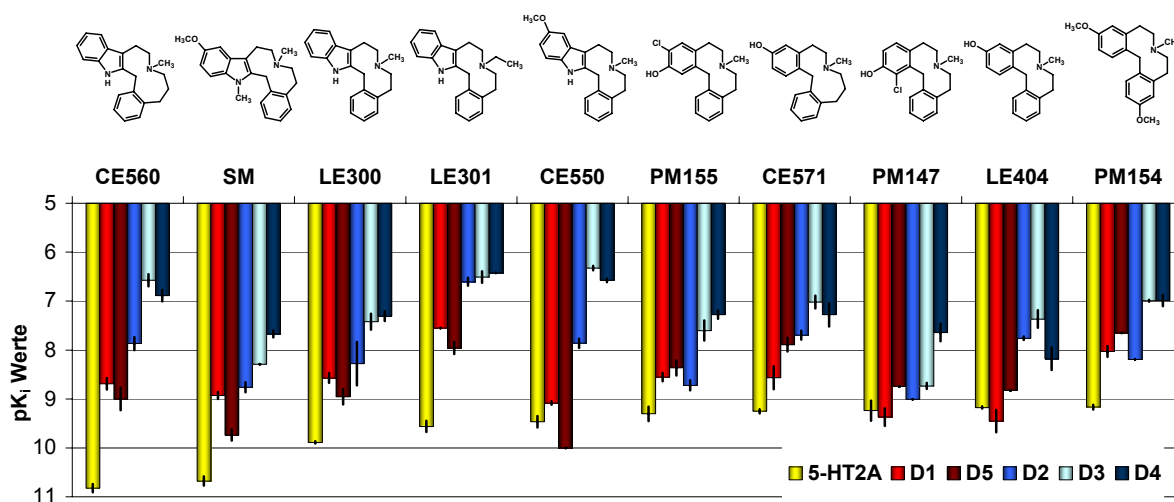


Abbildung D-4 Bindungsprofile der Azecine mit subnanomolaren Affinitäten am 5-HT_{2A} Rezeptor (absteigend nach 5-HT_{2A} Affinität geordnet)

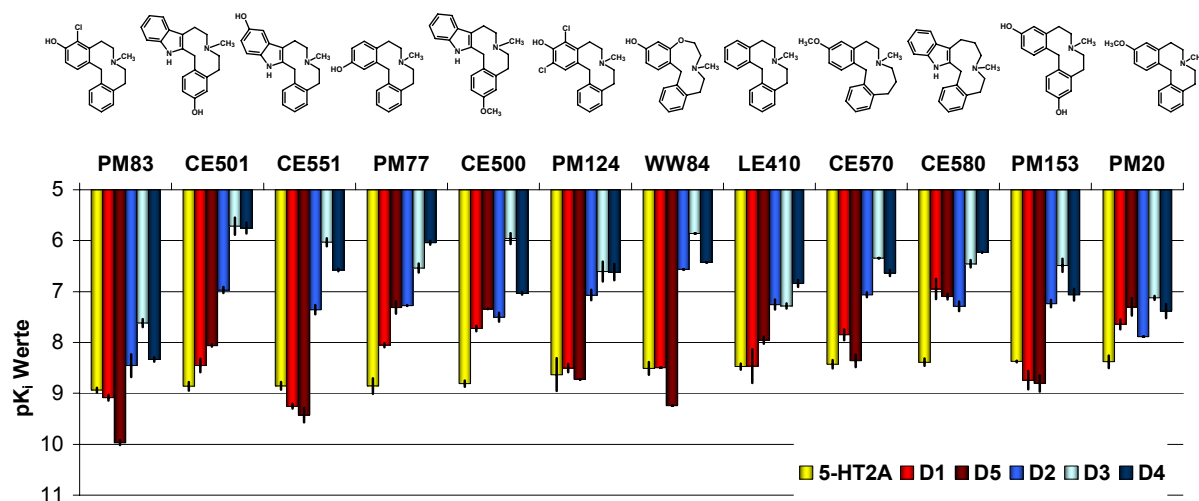


Abbildung D-5 Bindungsprofile von Azecinen mit Ki Werten von 1 bis 5nM am 5-HT_{2A} Rezeptor (absteigend nach 5-HT_{2A} Affinität geordnet)

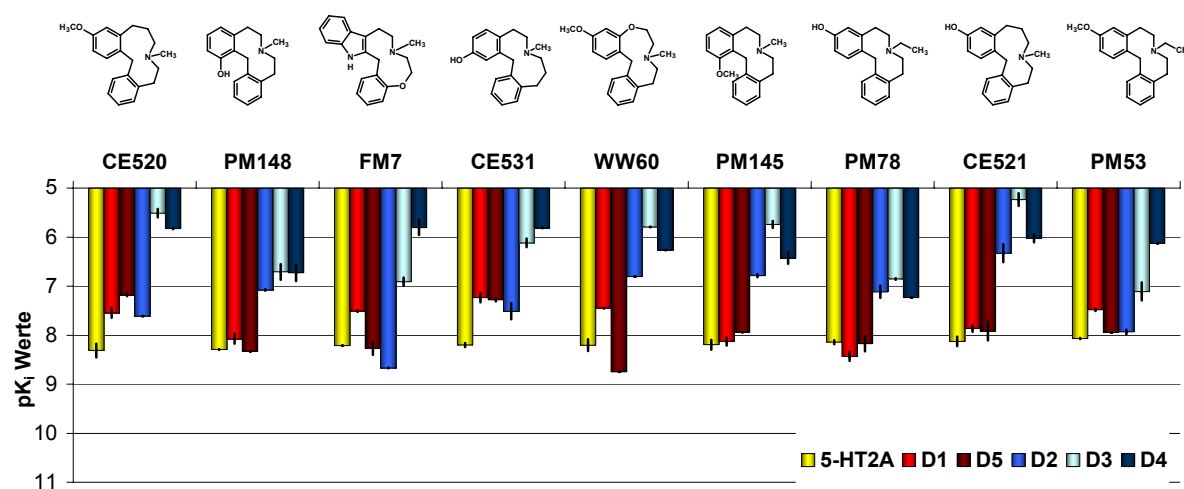


Abbildung D-6 Bindungsprofile von Azecinen mit Ki Werten zwischen 5 und 10nM am 5-HT_{2A} Rezeptor (absteigend nach 5-HT_{2A} Affinität geordnet)

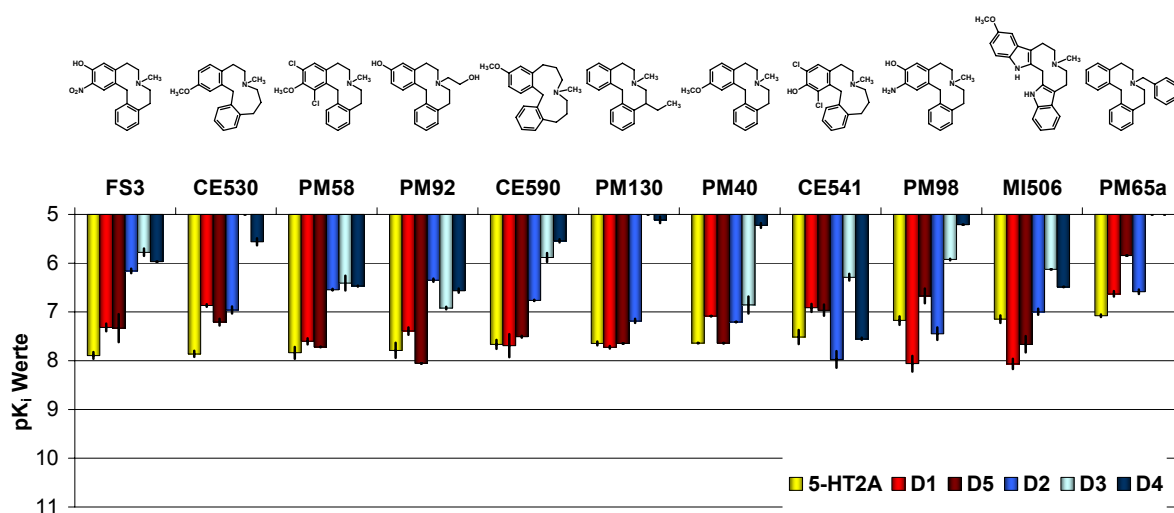


Abbildung D-7 Bindungsprofile von Azecinen mit K_i Werten von 10 bis 100nM am 5-HT_{2A} Rezeptor (absteigend nach 5-HT_{2A} Affinität)

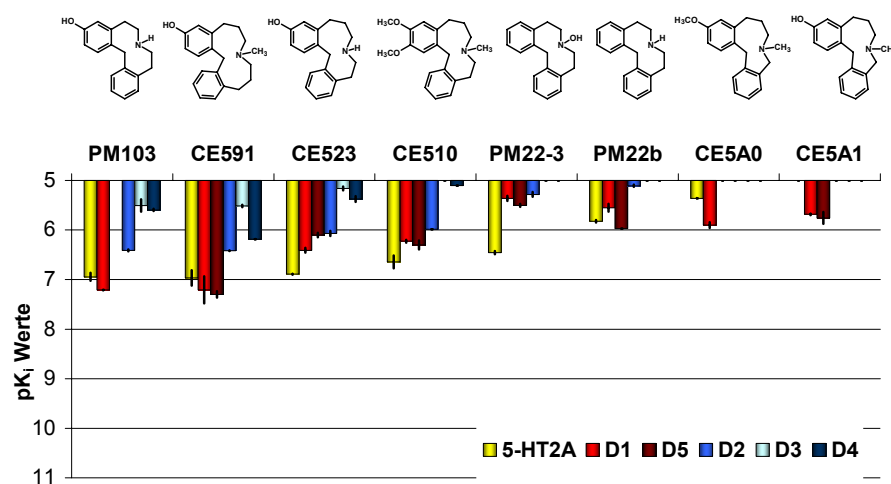
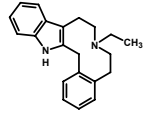
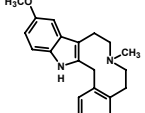
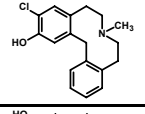
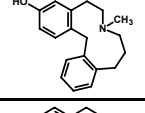
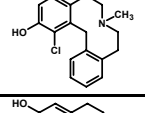
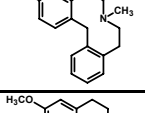
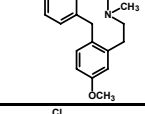
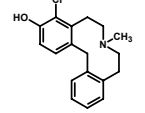
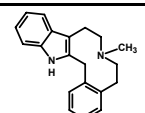
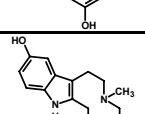
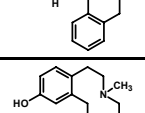
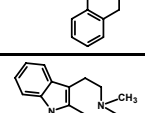
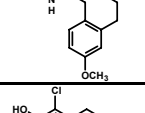
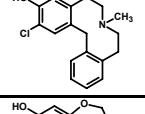


Abbildung D-8 Bindungsprofile von Azecinen mit K_i Werten über 100nM am 5-HT_{2A} Rezeptor (absteigend nach 5-HT_{2A} Affinität)

Code (weitere Chiffren)	Struktur	Affinitäten aus Radioligandbindungsexperimenten						Ergebnisse des Calcium Assays			
		K_i -Wert [nM] MW \pm SEM bzw. Senkung der gebundenen Radioaktivität durch eine 10 μ M Lösung der Testsubstanz						Antagonist (AN): K_i -Wert [nM] Agonist (AG): EC_{50} -Wert [nM] MW \pm SEM			
		5-HT _{2A}	D ₁	D ₅	D ₂	D ₃	D ₄	D ₁	D ₅	D ₂	D ₃
CE560 (LE-CE-560) (179)		0,02 \pm 0,01	2,15 \pm 0,65	1,15 \pm 0,56	14,2 \pm 4,15	278 \pm 75,5	134 \pm 35,8	AN 1,60 \pm 0,20	AN 2,85 \pm 0,85	AN 1,26 \pm 0,09	n.b.
SM (200)		0,02 \pm 0,005	2,00 \pm 1,60	0,19 \pm 0,05	1,80 \pm 0,40	5,16 \pm 0,05	21,6 \pm 3,55	AN 0,19 \pm 0,05	AN 0,14 \pm 0,03	AN 0,32 \pm 0,13	n.b.
LE300 (LE-RU-300) (34)		0,13 \pm 0,01	2,98 \pm 0,61	1,18 \pm 0,40	9,14 \pm 6,89	40,4 \pm 14,5	41,5 \pm 4,45	AN 7,36 \pm 3,43	n.b.	n.b.	n.b.

Code (weitere Chiffren)	Struktur	Affinitäten aus Radioligandbindungsexperimenten						Ergebnisse des Calcium Assays			
		K _i -Wert [nM] MW ± SEM bzw. Senkung der gebundenen Radioaktivität durch eine 10µM Lösung der Testsubstanz						Antagonist (AN): K _i -Wert [nM] Agonist (AG): EC ₅₀ -Wert [nM] MW ± SEM			
		5-HT _{2A}	D ₁	D ₅	D ₂	D ₃	D ₄	D ₁	D ₅	D ₂	D ₃
LE301 (LE-RU-301) (35)		0,29 ± 0,08	28,0	11,5 ± 3,20	253 ± 46,0	324 ± 85,5	379 ± 5,50	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
CE550 (LE-CE-550) (174)		0,36 ± 0,10	0,83 ± 0,06	0,10 ± 0,00	14,1 ± 2,75	475 ± 48,5	266 ± 22,0	AN 5,06 ± 2,49	AN 0,46 ± 0,20	AN 6,03 ± 1,95	AN 28,3
PM155 (LE-PM-454) (158)		0,54 ± 0,19	3,07 ± 1,29	4,72 ± 1,71	1,95 ± 0,45	27,7 ± 12,2	54,0 ± 9,82	AN 8,6	AN 3,11 ± 0,68	AN 4,77 ± 2,54	n.b.
CE571 (LE-CE-571) (185)		0,56 ± 0,06	3,23 ± 1,71	13,6 ± 4,30	20,7 ± 4,30	100 ± 29,0	60,2 ± 29,8	AN 14,1 ± 0,1	AN 3,90 ± 0,33	AN 37,1 ± 5,00	AN 10,6
PM147 (LE-PM-452) (156)		0,64 ± 0,28	0,46 ± 0,16	1,81	0,99 ± 0,02	1,88 ± 0,28	24,8 ± 9,65	AN 4,01 ± 0,33	AN 1,58 ± 0,46	AN 0,13 ± 0,05	n.b.
LE404 (LE-404) (44)		0,67 ± 0,04	0,39 ± 0,16	1,50 ± 0,00	17,5 ± 1,50	47,5 ± 16,3	7,63 ± 3,68	AN 1,35 ± 0,25	n.b.	n.b.	n.b.
PM154 (LE-PM-453) (157)		0,69 ± 0,08	9,40 ± 1,00	22,4	6,45 ± 0,15	102 ± 4,50	106 ± 24,8	AN 26,9 ± 11,4	AN 7,18 ± 1,48	AN 0,62 ± 0,23	n.b.
PM83 (LE-PM-436) (139)		1,17 ± 0,13	0,83 ± 0,11	0,11 ± 0,01	4,00 ± 1,90	24,6 ± 4,29	4,69 ± 0,49	AN 0,64 ± 0,18	AN 0,05 ± 0,02	AN 3,45 ± 1,25	n.b.
CE501 (LE-CE-501) (End2) (195)		1,40 ± 0,27	3,70 ± 1,10	8,71 ± 0,42	109 ± 15,3	2071 ± 777	1830 ± 440	AN 17,8 ± 4,5	AN 16,4 ± 2,25	AN 14,0 ± 3,6	n.b.
CE551 (LE-CE-551) (175)		1,42 ± 0,25	0,56 ± 0,06	0,40 ± 0,13	45,2 ± 8,24	944 ± 171	268 ± 15,5	AN 1,69 ± 0,67	AN 0,33	AN 32,4	AN 12,8
PM77 (LE-PM-428) (131)		1,51 ± 0,58	8,92 ± 0,82	51,7 ± 15,6	53,0 ± 1,00	296 ± 60,0	913 ± 79,0	AN 76,5 ± 16,5	AN 63,2	AN 2,55 ± 0,55	n.b.
CE500 (LE-CE-500) (End1) (194)		1,58 ± 0,23	19,0 ± 2,30	45,6 ± 0,70	28,45 ± 6,04	1135 ± 273	92,6 ± 5,30	AN 83,6 ± 17,1	AN 37,3 ± 11,6	AN 0,46 ± 0,11	n.b.
PM124 (LE-PM-442) (146)		3,02 ± 1,91	3,20 ± 0,60	1,90	88,0 ± 21,0	273 ± 115	258 ± 90,0	AN 3,79 ± 1,06	AN 1,36 ± 0,58	AN 37,5 ± 12,0	n.b.
WW84 (LE-WW-451) (114)		3,24 ± 0,83	3,20 ± 0,80	0,57 ± 0,10	274 ± 0,50	1384 ± 454	375 ± 106	AN 7,33	AN 4,52 ± 1,92	AN 159	n.b.

Code (weitere Chiffren)	Struktur	Affinitäten aus Radioligandbindungsexperimenten						Ergebnisse des Calcium Assays			
		K _i -Wert [nM] MW ± SEM bzw. Senkung der gebunden Radioaktivität durch eine 10µM Lösung der Testsubstanz						Antagonist (AN): K _i -Wert [nM] Agonist (AG): EC ₅₀ -Wert [nM] MW ± SEM			
		5-HT _{2A}	D ₁	D ₅	D ₂	D ₃	D ₄	D ₁	D ₅	D ₂	D ₃
LE410 (LE-410) (43)		3,42 ± 0,45	4,50 ± 2,90	11,2 ± 1,80	56,5 ± 12,5	52,0 ± 6,00	148 ± 22,0	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
CE570 (LE-CE-570) (183)		3,83 ± 0,71	14,5 ± 3,50	4,60 ± 1,40	87,0 ± 9,00	457 ± 32,5	234 ± 32,5	AN 26,2 ± 11,9	AN 134 ± 2,5	AN 16,1 ± 4,75	AN 6,9
CE580 (LE-CE-580) (187)		4,15 ± 0,69	128 ± 48,0	80,9 ± 10,7	52,5 ± 11,5	356 ± 59,0	593 ± 11,0	AN 465	AN 71,7 ± 6,55	AN 52,8	AN 56,0
PM153 (LE-PM-451) (155)		4,25 ± 0,17	2,03 ± 0,91	1,68 ± 0,60	58,7 ± 9,35	342 ± 98,5	90,0 ± 24,0	AN 3,22 ± 0,15	AN 0,76 ± 0,06	AN 19,1 ± 7,63	n.b.
PM20 (LE-PM-425) (128)		4,42 ± 1,27	23,4 ± 5,15	54,0 ± 20,5	13,0 ± 9,00	75,7 ± 7,30	43,4 ± 13,3	AN 24,1 ± 3,90	AN 7,19 ± 2,54	AN 0,55 ± 0,17	n.b.
CE520 (LE-CE-520) (163)		5,14 ± 1,60	29,5 ± 6,36	66,4 ± 4,64	24,4 ± 0,30	3136 ± 625	1488 ± 36,5	AN 222 ± 29,5	AN 48,1 ± 1,85	AN 25,0 ± 0,45	n.b.
PM148 (LE-PM-449) (153)		5,14 ± 0,09	8,70 ± 2,00	4,69 ± 2,75	84,1 ± 84,0	215 ± 84,0	202 ± 73,5	AN 64,1 ± 19,5	AN 10,44 ± 3,57	AN 7,9 ± 0,3	n.b.
FM7 (267)		6,11 ± 0,03	30,9 ± 1,07	5,68 ± 1,84	2,15 ± 0,04	125 ± 24,0	1661 ± 554	n.b.	AN 38,5 ± 10,5	n.b.	AN 79
CE531 (LE-CE-531) (170)		6,34 ± 0,63	59,6 ± 13,8	52,7 ± 3,64	33,0 ± 12,0	777 ± 154	1524	AN 622 ± 58,5	AN 118 ± 25,8	AN 36,9 ± 1,45	AN 7,7
WW60 (LE-WW-450) (113)		6,52 ± 1,60	35,5 ± 11,7	1,80 ± 0,20	158 ± 38,0	1601 ± 306	546 ± 110	AN 27,4	AN 19,4	AN 14,0	n.b.
PM145 (LE-PM-448) (152)		6,57 ± 1,36	7,55 ± 1,45	11,5 ± 3,63	164 ± 12,0	1833 ± 292	390 ± 106	AN 37,6 ± 1,2	AN 87,8	AN 17,4 ± 1,65	n.b.
PM78 (LE-PM-426) (129)		7,26 ± 0,71	3,80 ± 0,80	7,10 ± 2,40	80,5 ± 20,6	141 ± 4,50	58,6	AN 10,7 ± 0,7	AN 6,63 ± 1,03	AN 30,0 ± 5,3	n.b.
CE521 (LE-CE-521) (164)		7,70 ± 1,57	14,0 ± 2,04	13,8 ± 6,57	522 ± 182	6120 ± 1802	962 ± 186	AN 39,1 ± 11,0	AN 11,7 ± 1,03	AN 353 ± 12,0	n.b.
PM53 (LE-PM-427) (130)		8,55 ± 0,28	33,0 ± 2,00	11,3 ± 3,07	11,7 ± 1,30	85,1 ± 33,9	751	AN 281 ± 4,00	AN 266 ± 42,0	AN 3,67 ± 0,73	n.b.
FS3 (LE-PM-456) (160)		12,9 ± 2,04	49,0 ± 8,65	57,0 ± 33,0	698 ± 70,0	1698 ± 297	1068	AN 55,2 ± 8,55	AN 59,8 ± 21,7	AN 62,9 ± 24,5	n.b.

Code (weitere Chiffren)	Struktur	Affinitäten aus Radioligandbindungsexperimenten						Ergebnisse des Calcium Assays			
		K _i -Wert [nM] MW ± SEM bzw. Senkung der gebunden Radioaktivität durch eine 10µM Lösung der Testsubstanz						Antagonist (AN): K _i -Wert [nM] Agonist (AG): EC ₅₀ -Wert [nM] MW ± SEM			
		5-HT _{2A}	D ₁	D ₅	D ₂	D ₃	D ₄	D ₁	D ₅	D ₂	D ₃
CE530 (LE-CE-530) (169)		13,9 ± 2,00	136 ± 9,11	62,4 ± 9,45	112 ± 18,5	<60%		2764 ± 456	AN 251 ± 23,8	AN 298 ± 61,3	AN 432 ± 70,0 n.b.
PM58 (LE-PM-434) (137)		15,2 ± 4,53	25,3 ± 3,82	19,0	287 ± 9,50	415 ± 138	339 ± 6,50	AN 61,3 ± 0,25	AN 13,7 ± 0,83	AN 3,67 ± 0,73 n.b.	
PM92 (LE-PM-437) (141)		17,7 ± 6,60	41,0 ± 7,00	8,86	447 ± 33,5	121 ± 6,50	275 ± 27,5	AN 431	AN 150	AN 46,8 n.b.	
CE590 (LE-CE-590) (191)		22,0 ± 4,60	23,5 ± 11,7	30,9 ± 1,30	172 ± 5,00	1343 ± 281	2869 ± 199	AN 117 ± 38,6	AN 169 ± 17,0	AN 107 ± 25,5 n.b.	
PM130 (LE-PM-446) (150)		22,8 ± 2,05	18,9 ± 1,10	22,6 ± 0,05	65,45 ± 6,55	<60%		7808 ± 1184	AN 34,3 ± 1,15	AN 92,9	AN 105 ± 43,1 n.b.
PM40 (LE-PM-429) (132)		23,1 ± 0,15	82,0	22,9	62,0 ± 5,00	151 ± 57,5	5987 ± 675	AN 567 ± 70,0	AN 1051 ± 309	AN 21,2 ± 2,45 n.b.	
CE541 (LE-CE-541) (171)		32,2 ± 10,4	125 ± 24,9	114 ± 31,6	11,5 ± 4,24	523 ± 81,5	28,1 ± 1,40	AN 98,1 ± 18,0	AN 212	AN 466 n.b.	
PM98 (LE-PM-443) (147)		68,2 ± 13,7	9,30 ± 3,30	227 ± 75,5	37,3 ± 10,8	1187 ± 43,0	6198	AN 30,3	AN 39,5 ± 11,2	AN 251 n.b.	
MI506 (LE-MI-506) (202)		72,4 ± 12,9	8,90 ± 2,10	23,3 ± 8,50	102 ± 13,8	748	328	n.b.	n.b.	AN 289 n.b.	
PM65a (LE-PM-435) (138)		84,4 ± 5,05	237 ± 29,5	1419	263 ± 28,0	<60%		<60%	n.a.	n.a.	n.b. n.b.
PM103 (LE-PM-440) (144)		116 ± 20,3	61,4 ± 0,35	n.b.	389 ± 19,5	3271 ± 826	2533 ± 118	AN 127	AN 44,3 ± 16,1	AN 336 ± 52,2 n.b.	
CE591 (LE-CE-591) (192)		118 ± 42,0	80,1 ± 48,0	50,7 ± 7,65	383 ± 7,50	3069 ± 189	650	AN 345 ± 7,5	AN 213 ± 40,5	AN 25,8 ± 2,85 n.b.	
CE523 (LE-CE-523) (168)		129 ± 2,50	393 ± 43,0	797 ± 82,5	857 ± 98,0	6897 ± 595	4257 ± 563	n.a.	n.a.	AN 668 n.b.	
CE510 (LE-CE-510) (162)		237 ± 68,5	597 ± 40,0	511 ± 103	1028 ± 461	<60%		7891	AN 1684	n.a.	n.a. n.b.
PM22-3 (LE-PM-433) (136)		350 ± 26,5	4378 ± 538	3164 ± 228	5267 ± 589	<60%		<60%	n.a.	n.a.	n.a. n.b.


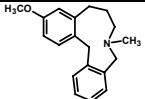
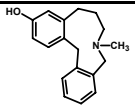
Code (weitere Chiffren)	Struktur	Affinitäten aus Radioligandbindungsexperimenten						Ergebnisse des Calcium Assays			
		K _i -Wert [nM] MW ± SEM bzw. Senkung der gebundenen Radioaktivität durch eine 10µM Lösung der Testsubstanz						Antagonist (AN): K _i -Wert [nM] Agonist (AG): EC ₅₀ -Wert [nM] MW ± SEM			
		5-HT _{2A}	D ₁	D ₅	D ₂	D ₃	D ₄	D ₁	D ₅	D ₂	D ₃
PM22b (LE-PM-432) (135)		1496 ± 89,0	2853 ± 514	1065	7810 ± 391	<60%	<60%	n.a.	n.a.	n.a.	n.b.
CE5A0 (MM75Me) (279)		4383 ± 45,5	1265 ± 166	<60%	<60%	<60%	<60%	n.a.	n.a.	n.a.	n.b.
CE5A1 (280)		<60%	2071 ± 76,5	1811 ± 478	<60%	<60%	<60%	AN 176	AN 114	n.b.	n.b.

Tabelle D-8 Bindungsdaten der Dibenz- und Indoloazecine und deren Homologen geordnet nach absteigender 5-HT_{2A} Affinität (Auszug aus Tabelle D4)

Folgende Fragestellungen sollen anhand dieser Bindungsdaten diskutiert werden:

- Sind die Indolderivate aufgrund ihrer Serotoninanteilstruktur in ihrer 5-HT_{2A} Affinität den Dibenzderivaten überlegen?
- Sind bezüglich der D₁ und D₂ Affinitäten Unterschiede zwischen Indol- und Dibenzderivaten zu beobachten?
- Kann die von Meltzer et al. aufgestellte „Serotonin-Dopamin“-Hypothese auf die untersuchten Azecine angewendet werden?
- Wie verhalten sich die D₁/D₂-, D₁/D₅- und 5-HT_{2A}/D₂-Selektivitäten der Indolderivate gegenüber den Selektivitäten der Dibenzderivate?
- Enzensperger et al. untersuchten einen kleineren Satz von Azecinen auf ihre antagonistische Aktivität an 5-HT_{2A} Rezeptoren in porcinen Koronararterien und stellten eine Korrelation der 5-HT_{2A} Aktivität mit der, in Radioligandbindungsstudien bestimmten, D₁ Affinität der Verbindungen fest [Enzensperger et al., 2008]. Lässt sich diese Beobachtung anhand der in der vorliegenden Arbeit gewonnenen, wesentlich umfangreicheren 5-HT_{2A}-Radioligandbindungsdaten bestätigen? Sind weitere Zusammenhänge erkennbar?
- Tritt die am D₁ Rezeptor beobachtete Überlegenheit der hydroxysubstituierten Verbindungen gegenüber den entsprechenden Methoxyverbindungen auch am 5-HT_{2A} Rezeptor auf?
- Wie verhalten sich die Bindungseigenschaften der Substanzen mit sauerstoffhaltigem zentralen Ring?

D.4.1.1 Bindungseigenschaften der Indolderivate im Vergleich zu den Dibenzderivaten

Die Benzindoloderivate, deren Leitstruktur das LE300 darstellt, vereinigen in ihrem Ringgerüst mit dem Tryptamin- und dem Phenylethylaminanteil die Grundstrukturen der endogenen Liganden Serotonin und Dopamin. Dagegen findet sich in den vom LE404 abgeleiteten Dibenzderivaten nur die Phenylethylaminstruktur des Dopamins und/oder eine homologe Phenylpropylaminstruktur wieder. Weiterhin wurden Bisindoloderivate untersucht, denen die Phenylethylaminstruktur fehlt und deren Ringgerüst stattdessen zwei Tryptaminmoleküle vereinigt.

Es stellt sich nun die Frage, ob die Ähnlichkeit zum endogenen Liganden einen Einfluss auf die Bindungseigenschaften zum Serotonin 5-HT_{2A} Rezeptor und den Dopaminrezeptoren erkennen lässt. Sind die Indolderivate aufgrund der Ähnlichkeit zum Serotonin in ihrer Affinität am 5-HT_{2A} Rezeptor den Dibenzderivaten überlegen? Haben die Dibenzderivate eine höhere Affinität zu den Dopaminrezeptoren als zum 5-HT_{2A} Rezeptor? Wie verhalten sich die Bisindoloderivate?

Im Folgenden sollen die Bindungseigenschaften der Indol- und der Dibenzderivate am 5-HT_{2A} Rezeptor und den Dopaminrezeptorsubtypen D₁ und D₂, als Vertreter der jeweiligen Rezeptorfamilie, einander gegenübergestellt werden. Es wird betrachtet, wie hoch innerhalb der Verbindungsklasse der absolute und prozentuale Anteil an Verbindungen mit einem K_i-Wert < 100 nM (nanomolare und subnanomolare Affinität) am jeweiligen Rezeptor ist. Weiterhin wurde der Anteil (absolut und prozentual) an Verbindungen bestimmt, deren K_i-Wert unter 10 nM (Affinität im unteren nanomolaren und subnanomolaren Bereich) liegt und auch wie viele der Verbindungen Affinitäten im subnanomolaren Bereich (K_i-Wert < 1 nM) besitzen. Die ermittelten Werte sind Tabelle D-9 zu entnehmen. Die prozentualen Anteile wurden einmal auf die Gesamtanzahl der vermessenen Verbindungen (Werte in orange dargestellt) und einmal auf die Anzahl von Verbindungen mit einem K_i-Wert < 100 nM (Werte in blau) bezogen.

Zum Beispiel haben alle untersuchten Indolderivate am 5-HT_{2A} Rezeptor einen K_i-Wert unter 100 nM, wobei mit 91% der größte Teil der K_i-Werte unter 10 nM und 45% der Werte sogar im subnanomolaren Bereich liegen. Von 39 am 5-HT_{2A} Rezeptor untersuchten Dibenzderivaten haben nur 80% einen K_i-Wert unter 100 nM. Hier sind allerdings auch die umfangreicheren Strukturvariationen der Dibenzderivate gegenüber den Indolderivaten zu berücksichtigen, deshalb sollen in die folgende Betrachtung nur die Strukturen mit nanomolarer und besserer (K_i-Wert < 100 nM) Affinität zum 5-HT_{2A} Rezeptor eingehen. Die 31 Verbindungen mit einem K_i-Wert < 100 nM werden als 100% angenommen. Darauf bezogen haben 68% der Dibenzderivate einen K_i-Wert von unter 10 nM, das sind 23% weniger als bei den Indolderivaten. Eine Affinität im subnanomolaren Bereich haben 16% der Dibenzderivate, aber 45% der Indolderivate. Insgesamt betrachtet zeigen also die Indolderivate höhere

Affinitäten zum 5-HT_{2A} Rezeptor als die Dibenzderivate. Auch am D₁ und D₂ Rezeptor lässt sich diese Tendenz beobachten (siehe Tabelle D-9).

Vergleicht man des Weiteren die Anteile hochaffiner Substanzen innerhalb der Verbindungsklasse der Indolderivate an den verschiedenen Rezeptoren, so lässt sich feststellen, dass der Anteil hochaffiner Verbindungen in der Reihenfolge 5-HT_{2A}, D₁, D₂ abnimmt. So haben, bezogen auf die Verbindungen mit einem K_i-Wert unter 100nM, 91% der Indolverbindungen einen K_i-Wert kleiner 10nM, am D₁ Rezeptor sind es 64% und am D₂ Rezeptor 33%. Auch im subanomolaren Bereich ist diese Reihenfolge zu beobachten. Dieser Sachverhalt gilt ebenso für die Anteile hochaffiner Verbindungen unter den Dibenzderivaten (siehe Tabelle D-9).

Rezeptor	Verbindungs- klasse	Anzahl getesteter Verbindungen	K _i -Wert <100nM *	K _i -Wert <10nM *	K _i -Wert <1nM *
5-HT _{2A}	Indolderivate	11	11 100% 100%	10 91% 91%	5 45% 45%
	Dibenzderivate	39	31 80% 100%	21 54% 68%	5 13% 16%
D ₁	Indolderivate	12	11 92% 100%	7 58% 64%	2 17% 18%
	Dibenzderivate	39	30 77% 100%	15 38% 50%	3 8% 10%
D ₂	Indolderivate	12	9 75% 100%	3 25% 33%	0 - -
	Dibenzderivate	39	21 54% 100%	4 10% 19%	1 2% 5%

* Anzahl Verbindungen

Anteil an der Gesamtzahl getesteter Verbindungen [%]

Prozentualer Anteil bezogen auf Anzahl der Verbindungen mit K_i-Wert <100nM

Tabelle D-9 Vergleich von Indol- und Dibenzderivaten

Die Tryptaminteilstruktur der Indolderivate scheint sich demnach nicht nur wie erwartet auf die Affinität zum 5-HT_{2A} Rezeptor, sondern auch auf die D₁ und D₂ Affinität positiv auszuwirken.

Obwohl die Dibenzderivate, verglichen mit den Indolderivaten geringere Affinitäten zum 5-HT_{2A} Rezeptor zeigen, ist deren Anteil an hochaffinen Substanzen am 5-HT_{2A} Rezeptor, verglichen mit dem D₁ und D₂ Rezeptor, am höchsten. Das Vorhandensein der dopaminergen Phenylethylaminstruktur ohne die Tryptaminstruktur der Benzindoloverbin-

dungen bedingt also keine bevorzugte Bindung an den Dopaminrezeptorsubtypen gegenüber dem 5-HT_{2A} Rezeptor. Das Bisindoloderivat MI506 zeigt mit einem K_i-Wert von 72,4nM eine gute Affinität am 5-HT_{2A} Rezeptor, allerdings ist es unter allen untersuchten Indolderivaten die Verbindung mit der geringsten 5-HT_{2A} Affinität. In Tabelle D-10 und Tabelle D-11 sind die Strukturen und K_i-Werte der untersuchten Verbindungen, getrennt nach Indol- und Dibenzderivaten, in der Reihenfolge ihrer 5-HT_{2A} Affinität aufgeführt.

Bei den besonders affinen Verbindungen SM und CE560 wäre es ratsam, anhand von Schild Plot-Experimenten zu untersuchen, ob es sich wirklich, wie angenommen, um einen kompetitiven Bindungsmechanismus handelt oder ob andere Einflüsse an diesen außerordentlich hohen Affinitäten beteiligt sind. Für die Leitsubstanz LE300 wurden derartige Experimente an D₁, D₂ und D₅ Rezeptoren bereits durchgeführt und damit deren kompetitiver Antagonismus an diesen Rezeptoren bestätigt [Kassack et al., 2002a].

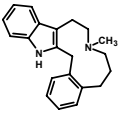
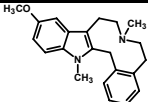
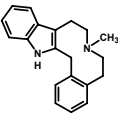
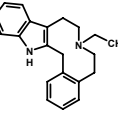
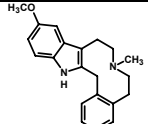
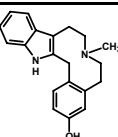
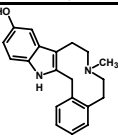
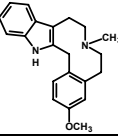
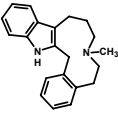
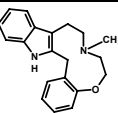
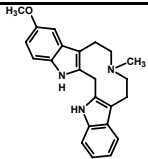
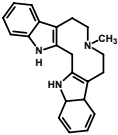
Code (weitere Chiffren)	Struktur	Affinitäten aus Radioligandbindungsexperimenten						Ergebnisse des Calcium Assays			
		K _i -Wert [nM] MW ± SEM bzw. Senkung der gebunden Radioaktivität durch eine 10µM Lösung der Testsubstanz						Antagonist (AN): K _i -Wert [nM] Agonist (AG): EC ₅₀ -Wert [nM] MW ± SEM			
		5-HT _{2A}	D ₁	D ₅	D ₂	D ₃	D ₄	D ₁	D ₅	D ₂	D ₃
CE560 (LE-CE-560) (179)		0,02 ± 0,01	2,15 ± 0,65	1,15 ± 0,56	14,2 ± 4,15	278 ± 75,5	134 ± 35,8	AN 1,60 ± 0,20	AN 2,85 ± 0,85	AN 1,26 ± 0,09	n.b.
SM (200)		0,02 ± 0,005	2,00 ± 1,60	0,19 ± 0,05	1,80 ± 0,40	5,16 ± 0,05	21,6 ± 3,55	AN 0,19 ± 0,05	AN 0,14 ± 0,03	AN 0,32 ± 0,13	n.b.
LE300 (LE-RU-300) (34)		0,13 ± 0,01	2,98 ± 0,61	1,18 ± 0,40	9,14 ± 6,89	40,4 ± 14,5	41,5 ± 4,45	AN 7,36 ± 3,43	n.b.	n.b.	n.b.
LE301 (LE-RU-301) (35)		0,29 ± 0,08	28,0	11,5 ± 3,20	253 ± 46,0	324 ± 85,5	379 ± 5,50	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
CE550 (LE-CE-550) (174)		0,36 ± 0,10	0,83 ± 0,06	0,10 ± 0,00	14,1 ± 2,75	475 ± 48,5	266 ± 22,0	AN 5,06 ± 2,49	AN 0,46 ± 0,20	AN 6,03 ± 1,95	AN 28,3
CE501 (LE-CE-501) (End2) (195)		1,40 ± 0,27	3,70 ± 1,10	8,71 ± 0,42	109 ± 15,3	2071 ± 777	1830 ± 440	AN 17,8 ± 4,5	AN 16,4 ± 2,25	AN 14,0 ± 3,6	n.b.
CE551 (LE-CE-551) (175)		1,42 ± 0,25	0,56 ± 0,06	0,40 ± 0,13	45,2 ± 8,24	944 ± 171	268 ± 15,5	AN 1,69 ± 0,67	AN 0,33	AN 32,4	AN 12,8
CE500 (LE-CE-500) (End1) (194)		1,58 ± 0,23	19,0 ± 2,30	45,6 ± 0,70	28,45 ± 6,04	1135 ± 273	92,6 ± 5,30	AN 83,6 ± 17,1	AN 37,3 ± 11,6	AN 0,46 ± 0,11	n.b.
CE580 (LE-CE-580) (187)		4,15 ± 0,69	128 ± 48,0	80,9 ± 10,7	52,5 ± 11,5	356 ± 59,0	593 ± 11,0	AN 465	AN 71,7 ± 6,55	AN 52,8	AN 56,0
FM7 (267)		6,11 ± 0,03	30,9 ± 1,07	5,68 ± 1,84	2,15 ± 0,04	125 ± 24,0	1661 ± 554	n.b.	AN 38,5 ± 10,5	n.b.	AN 79
MI506 (LE-MI-506) (202)		72,4 ± 12,9	8,90 ± 2,10	23,3 ± 8,50	102 ± 13,8	748	328	n.b.	n.b.	AN 289	n.b.
LE441 (LE-RU-441) (TW64) (394)		n.b.	23,5 ± 6,09	10,64 ± 4,61	93,8 ± 30,3	2423 ± 92,0	55,7 ± 3,35	AN 54,5 ± 0,5	AN 32,7 ± 7,2	AN 33,5 ± 12,5	

Tabelle D-10 Bindungsdaten der Benzindolo- und Bisindoloderivate geordnet nach absteigender 5-HT_{2A} Affinität
(Auszug aus Tabelle D-4)

Code (weitere Chiffren)	Struktur	Affinitäten aus Radioligandbindungsexperimenten						Ergebnisse des Calcium Assays			
		K _i -Wert [nM] MW ± SEM bzw. Senkung der gebunden Radioaktivität durch eine 10µM Lösung der Testsubstanz						Antagonist (AN): K _i -Wert [nM] Agonist (AG): EC ₅₀ -Wert [nM] MW ± SEM			
		5-HT _{2A}	D ₁	D ₅	D ₂	D ₃	D ₄	D ₁	D ₅	D ₂	D ₃
PM155 (LE-PM-454) (158)		0,54 ± 0,19	3,07 ± 1,29	4,72 ± 1,71	1,95 ± 0,45	27,7 ± 12,2	54,0 ± 9,82	AN 8,6	AN 3,11 ± 0,68	AN 4,77 ± 2,54	n.b.
CE571 (LE-CE-571) (185)		0,56 ± 0,06	3,23 ± 1,71	13,6 ± 4,30	20,7 ± 4,30	100 ± 29,0	60,2 ± 29,8	AN 14,1 ± 0,1	AN 3,90 ± 0,33	AN 37,1 ± 5,00	AN 10,6
PM147 (LE-PM-452) (156)		0,64 ± 0,28	0,46 ± 0,16	1,81	0,99 ± 0,02	1,88 ± 0,28	24,8 ± 9,65	AN 4,01 ± 0,33	AN 1,58 ± 0,46	AN 0,13 ± 0,05	n.b.
LE404 (LE-404) (44)		0,67 ± 0,04	0,39 ± 0,16	1,50 ± 0,00	17,5 ± 1,50	47,5 ± 16,3	7,63 ± 3,68	AN 1,35 ± 0,25	n.b.	n.b.	n.b.
PM154 (LE-PM-453) (157)		0,69 ± 0,08	9,40 ± 1,00	22,4	6,45 ± 0,15	102 ± 4,50	106 ± 24,8	AN 26,9 ± 11,4	AN 7,18 ± 1,48	AN 0,62 ± 0,23	n.b.
PM83 (LE-PM-436) (139)		1,17 ± 0,13	0,83 ± 0,11	0,11 ± 0,01	4,00 ± 1,90	24,6 ± 4,29	4,69 ± 0,49	AN 0,64 ± 0,18	AN 0,05 ± 0,02	AN 3,45 ± 1,25	n.b.
PM77 (LE-PM-428) (131)		1,51 ± 0,58	8,92 ± 0,82	51,7 ± 15,6	53,0 ± 1,00	296 ± 60,0	913 ± 79,0	AN 76,5 ± 16,5	AN 63,2	AN 2,55 ± 0,55	n.b.
PM124 (LE-PM-442) (146)		3,02 ± 1,91	3,20 ± 0,60	1,90	88,0 ± 21,0	273 ± 115	258 ± 90,0	AN 3,79 ± 1,06	AN 1,36 ± 0,58	AN 37,5 ± 12,0	n.b.
WW84 (LE-WW-451) (114)		3,24 ± 0,83	3,20 ± 0,80	0,57 ± 0,10	274 ± 0,50	1384 ± 454	375 ± 106	AN 7,33	AN 4,52 ± 1,92	AN 159	n.b.
LE410 (LE-410) (43)		3,42 ± 0,45	4,50 ± 2,90	11,2 ± 1,80	56,5 ± 12,5	52,0 ± 6,00	148 ± 22,0	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
CE570 (LE-CE-570) (183)		3,83 ± 0,71	14,5 ± 3,50	4,60 ± 1,40	87,0 ± 9,00	457	234 ± 32,5	AN 26,2 ± 11,9	AN 134 ± 2,5	AN 16,1 ± 4,75	AN 6,9
PM153 (LE-PM-451) (155)		4,25 ± 0,17	2,03 ± 0,91	1,68 ± 0,60	58,7 ± 9,35	342 ± 98,5	90,0 ± 24,0	AN 3,22 ± 0,15	AN 0,76 ± 0,06	AN 19,1 ± 7,63	n.b.
PM20 (LE-PM-425) (128)		4,42 ± 1,27	23,4 ± 5,15	54,0 ± 20,5	13,0 ± 9,00	75,7 ± 7,30	43,4 ± 13,3	AN 24,1 ± 3,90	AN 7,19 ± 2,54	AN 0,55 ± 0,17	n.b.
CE520 (LE-CE-520) (163)		5,14 ± 1,60	29,5 ± 6,36	66,4 ± 4,64	24,4 ± 0,30	3136 ± 625	1488 ± 36,5	AN 222 ± 29,5	AN 48,1 ± 1,85	AN 25,0 ± 0,45	n.b.
PM148 (LE-PM-449) (153)		5,14 ± 0,09	8,70 ± 2,00	4,69	84,1 ± 2,75	215 ± 84,0	202 ± 73,5	AN 64,1 ± 19,5	AN 10,44 ± 3,57	AN 7,9 ± 0,3	n.b.

Code (weitere Chiffren)	Struktur	Affinitäten aus Radioligandbindungsexperimenten						Ergebnisse des Calcium Assays			
		K _i -Wert [nM] MW ± SEM bzw. Senkung der gebunden Radioaktivität durch eine 10µM Lösung der Testsubstanz						Antagonist (AN): K _i -Wert [nM] Agonist (AG): EC ₅₀ -Wert [nM] MW ± SEM			
		5-HT _{2A}	D ₁	D ₅	D ₂	D ₃	D ₄	D ₁	D ₅	D ₂	D ₃
CE531 (LE-CE-531) (170)		6,34 ± 0,63	59,6 ± 13,8	52,7 ± 3,64	33,0 ± 12,0	777 ± 154	1524	AN 622 ± 58,5	AN 118 ± 25,8	AN 36,9 ± 1,45	AN 7,7
WW60 (LE-WW-450) (113)		6,52 ± 1,60	35,5 ± 11,7	1,80 ± 0,20	158 ± 38,0	1601 ± 306	546 ± 110	AN 27,4	AN 19,4	AN 14,0	n.b.
PM145 (LE-PM-448) (152)		6,57 ± 1,36	7,55 ± 1,45	11,5 ± 3,63	164 ± 12,0	1833 ± 292	390 ± 106	AN 37,6 ± 1,2	AN 87,8	AN 17,4 ± 1,65	n.b.
PM78 (LE-PM-426) (129)		7,26 ± 0,71	3,80 ± 0,80	7,10 ± 2,40	80,5 ± 20,6	141 ± 4,50	58,6	AN 10,7 ± 0,7	AN 6,63 ± 1,03	AN 30,0 ± 5,3	n.b.
CE521 (LE-CE-521) (164)		7,70 ± 1,57	14,0 ± 2,04	13,8 ± 6,57	522 ± 182	6120 ± 1802	962 ± 186	AN 39,1 ± 11,0	AN 11,7 ± 1,03	AN 353 ± 12,0	n.b.
PM53 (LE-PM-427) (130)		8,55 ± 0,28	33,0 ± 2,00	11,3 ± 3,07	11,7 ± 1,30	85,1 ± 33,9	751	AN 281 ± 4,00	AN 266 ± 42,0	AN 3,67 ± 0,73	n.b.
FS3 (LE-PM-456) (160)		12,9 ± 2,04	49,0 ± 8,65	57,0 ± 33,0	698 ± 70,0	1698 ± 297	1068	AN 55,2 ± 8,55	AN 59,8 ± 21,7	AN 62,9 ± 24,5	n.b.
CE530 (LE-CE-530) (169)		13,9 ± 2,00	136 ± 9,11	62,4 ± 9,45	112 ± 18,5	<60%	2764 ± 456	AN 251 ± 23,8	AN 298 ± 61,3	AN 432 ± 70,0	n.b.
PM58 (LE-PM-434) (137)		15,2 ± 4,53	25,3 ± 3,82	19,0	287 ± 9,50	415 ± 138	339 ± 6,50	AN 61,3 ± 0,25	AN 13,7 ± 0,83	AN 3,67 ± 0,73	n.b.
PM92 (LE-PM-437) (141)		17,7 ± 6,60	41,0 ± 7,00	8,86	447 ± 33,5	121 ± 6,50	275 ± 27,5	AN 431	AN 150	AN 46,8	n.b.
CE590 (LE-CE-590) (191)		22,0 ± 4,60	23,5 ± 11,7	30,9 ± 1,30	172 ± 5,00	1343 ± 281	2869 ± 199	AN 117 ± 38,6	AN 169 ± 17,0	AN 107 ± 25,5	n.b.
PM130 (LE-PM-446) (150)		22,8 ± 2,05	18,9 ± 1,10	22,6 ± 0,05	65,45 ± 6,55	<60%	7808 ± 1184	AN 34,3 ± 1,15	AN 92,9	AN 105 ± 43,1	n.b.
PM40 (LE-PM-429) (132)		23,1 ± 0,15	82,0	22,9	62,0 ± 5,00	151 ± 57,5	5987 ± 675	AN 567 ± 70,0	AN 1051 ± 309	AN 21,2 ± 2,45	n.b.
CE541 (LE-CE-541) (171)		32,2 ± 10,4	125 ± 24,9	114 ± 31,6	11,5 ± 4,24	523 ± 81,5	28,1 ± 1,40	AN 98,1 ± 18,0	AN 212	AN 466	n.b.
PM98 (LE-PM-443) (147)		68,2 ± 13,7	9,30 ± 3,30	227 ± 75,5	37,3 ± 10,8	1187 ± 43,0	6198	AN 30,3	AN 39,5 ± 11,2	AN 251	n.b.
PM65a (LE-PM-435) (138)		84,4 ± 5,05	237 ± 29,5	1419	263 ± 28,0	<60%	<60%	n.a.	n.a.	n.b.	n.b.

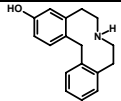
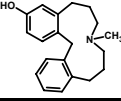
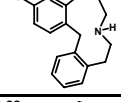
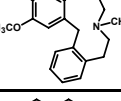
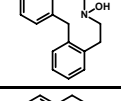
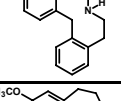
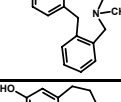
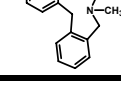
Code (weitere Chiffren)	Struktur	Affinitäten aus Radioligandbindungsexperimenten						Ergebnisse des Calcium Assays			
		K _i -Wert [nM] MW ± SEM bzw. Senkung der gebunden Radioaktivität durch eine 10µM Lösung der Testsubstanz						Antagonist (AN): K _i -Wert [nM] Agonist (AG): EC ₅₀ -Wert [nM] MW ± SEM			
		5-HT _{2A}	D ₁	D ₅	D ₂	D ₃	D ₄	D ₁	D ₅	D ₂	D ₃
PM103 (LE-PM-440) (144)		116 ± 20,3	61,4 ± 0,35	n.b.	389 ± 19,5	3271 ± 826	2533 ± 118	AN 127	AN 44,3 ± 16,1	AN 336 ± 52,2	n.b.
CE591 (LE-CE-591) (192)		118 ± 42,0	80,1 ± 48,0	50,7 ± 7,65	383 ± 7,50	3069 ± 189	650	AN 345 ± 7,5	AN 213 ± 40,5	AN 25,8 ± 2,85	n.b.
CE523 (LE-CE-523) (168)		129 ± 2,50	393 ± 43,0	797 ± 82,5	857 ± 98,0	6897 ± 595	4257 ± 563	n.a.	n.a.	AN 668	n.b.
CE510 (LE-CE-510) (162)		237 ± 68,5	597 ± 40,0	511 ± 103	1028 ± 461	<60%	7891	AN 1684	n.a.	n.a.	n.b.
PM22-3 (LE-PM-433) (136)		350 ± 26,5	4378 ± 538	3164 ± 228	5267 ± 589	<60%	<60%	n.a.	n.a.	n.a.	n.b.
PM22b (LE-PM-432) (135)		1496 ± 89,0	2853 ± 514	1065	7810 ± 391	<60%	<60%	n.a.	n.a.	n.a.	n.b.
CE5A0 (MM75Me) (279)		4383 ± 45,5	1265 ± 166	<60%	<60%	<60%	<60%	n.a.	n.a.	n.a.	n.b.
CE5A1 (280)		<60%	2071 ± 76,5	1811 ± 478	<60%	<60%	<60%	AN 176	AN 114	n.b.	n.b.

Tabelle D-11 Bindungsdaten der Dibenzderivate geordnet nach absteigender 5-HT_{2A} Affinität (Auszug aus Tabelle D-4)

D.4.1.2 Rezeptorselektivität und -subtypselektivität der Diarylazecin-, Diarylundecan- und Diaryldodecanderivate

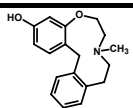
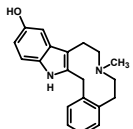
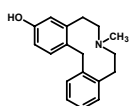
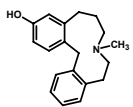
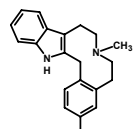
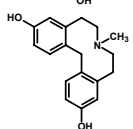
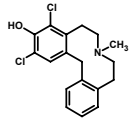
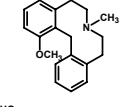
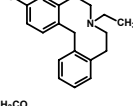
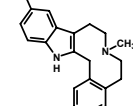
Azecine und deren Homologe sind als potente Dopaminantagonisten bekannt, die bevorzugt an Rezeptoren der Dopamin D₁ Familie binden ([Hoefgen et al., 2006; Enzensperger et al., 2007b]). Die D₂/D₁ Selektivität aller untersuchten Indol- und Dibenzverbindungen soll daher an dieser Stelle betrachtet werden.

Insgesamt wurden 50 Verbindungen vom Azecintyp untersucht. Dabei handelt es sich um 11 Indolderivate und 39 Dibenzderivate. Eine Übersicht der Selektivitätsprofile aller Verbindungen ist dem Anhang (Tabellen 1 bis 4) zu entnehmen. Die Verbindungen haben zum großen Teil eine höhere Affinität zum D₁ Rezeptor als zum D₂ Rezeptor. Von einer nennenswerten D₁ Selektivität kann man allerdings nur bei 16 der 50 untersuchten Verbindungen sprechen, d.h. diese 16 Verbindungen besitzen zum D₁ Rezeptor eine mindestens 10-fach höhere Affinität als zum D₂ Rezeptor. Tabelle D-12 fasst die selektiven Verbindungen in der Reihenfolge ihres D₂/D₁ Verhältnisses zusammen.

Unter den D_2/D_1 selektiven Verbindungen befinden sich 4 der 11 untersuchten Indolderivate und 12 der 39 Dibenzderivate.

Zwei der in Tabelle D-12 aufgeführten Verbindungen zeigen bezüglich ihrer D_2/D_1 Affinität ein umgekehrtes Selektivitätsprofil, d.h. sie haben eine höhere Affinität zum D_2 Rezeptor (siehe Tabelle D-12). Dabei handelt es sich um die dichlorohydroxy-substituierte Dibenzoverbindung CE541 und die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierte Benzindoloverbindung FM7 mit sauerstoffhaltigem zentralen Ring. Beide Verbindungen besitzen einen zum 11-Ring erweiterten zentralen Heterocyclus.

Mit Ausnahme der Bisindoloverbindung MI506 zeigen alle D_1 selektiven Verbindungen aus Tabelle D-12 im Vergleich zur D_2 Affinität auch eine deutliche Selektivität zum 5-HT_{2A} Rezeptor.

Code	Struktur	D_2/D_1	D_5/D_1	$D_1/5\text{-HT}_{2A}$	$D_2/5\text{-HT}_{2A}$
WW84		85,63	0,18	0,99	84,57
CE551		80,67	0,71	0,39	31,81
LE404		44,49	3,81	0,59	26,32
CE521		37,37	0,99	1,81	67,76
CE501		29,39	2,35	2,64	77,68
PM153		28,89	0,82	0,48	13,84
PM124		27,50	0,59	1,06	29,14
PM145		21,72	1,53	1,15	24,95
PM78		21,19	1,87	0,52	11,10
CE550		17,07	0,12	2,32	39,68

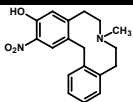
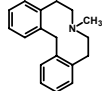
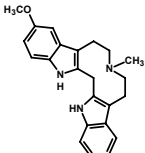
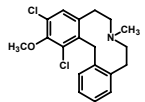
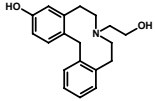
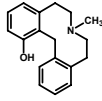
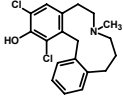
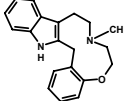
Code	Struktur	D ₂ /D ₁	D ₅ /D ₁	D ₁ /5-HT _{2A}	D ₂ /5-HT _{2A}
FS3		14,26	1,16	3,78	53,94
LE410		12,56	2,49	1,32	16,52
MI506		11,48	2,62	0,12	1,41
PM58		11,34	0,75	1,66	18,84
PM92		10,89	0,22	2,32	25,23
PM148		9,66	0,54	1,69	16,37
CE541		0,09	0,91	3,87	0,36
FM7		0,07	0,18	5,06	0,35

Tabelle D-12 Verbindungen mit nennenswerter Selektivität zum D₁ oder D₂ Rezeptor in der Reihenfolge ihrer Selektivität

Das als D₁-selektiv bekannte LE300 [Kassack et al., 2002a] als Leitstruktur der Benzindolazecine ist nicht in Tabelle D-12 enthalten, da es in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten lediglich eine 3-fach höhere Affinität zum D₁ Rezeptor zeigte. Bisher publizierte Affinitätsdaten des Arbeitskreises wurden im Isotopenlabor des pharmazeutischen Institutes der Universität Bonn gewonnen und zeigten eine 20-fache Selektivität zum D₁ Rezeptor gegenüber dem D₂ Rezeptor. Die aktuellen, im Labor der Universität Jena durchgeführten Experimente ergaben gegenüber den in Bonn erhobenen Daten eine im Vergleich dazu höhere Affinität zum D₂ Rezeptor, was mit einer herabgesetzten Selektivität einhergeht (siehe Tabelle D-13).

Ursachen für diese Abweichung können Unterschiede in der Durchführung der Experimente in den verschiedenen Isotopenlaboren sein. Beim Vergleich der unter Abschnitt C.2.2 beschriebenen Versuchsbedingungen mit der von Kassack et al. publizierten Durchführung [Kassack et al., 2002a] konnten folgende Abweichungen festgestellt werden: In Bonn wurden die Bindungsexperimente unter Verwendung von Membranpräparationen durchgeführt, während in Jena mit Ganzzeellsuspension gearbeitet wurde. Zudem unterscheiden sich die Inkubationszeiten (Bonn: 60min, Jena: 90min) und das Verfahren zur Trennung des

ungebundenen Radioliganden von den Rezeptor-Ligand-Komplexen. Während die Versuchsansätze in Bonn per Hand über Glasfaserrundfilter abgesaugt und zweimal mit je 5ml Eiswasser gewaschen wurden, wurden diese Arbeitsschritte in Jena halbautomatisch mittels eines Harvesters ausgeführt, wobei hier bei Raumtemperatur vier Waschzyklen durchlaufen wurden. Je nach Stabilität der Rezeptor-Ligand-Komplexe und Geschwindigkeit der Gleichgewichtseinstellung, können sich abweichende Inkubationszeiten sowie Wasch- und Filtrationsbedingungen auf das Messergebnis auswirken.

Rezeptor	Affinitäten aus Radioligandbindungsexperimenten			
	Universität Jena K _i -Wert [nM] ± SEM		Universität Bonn K _i -Wert [nM] ± SD [Kassack et al., 2002a]	
	HEK-Zellen	CHO-Zellen	HEK-Zellen	CHO-Zellen
D ₁	2,98 ± 0,61		4,9 ± 1,6	1,9 ± 0,5
D ₂	9,14 ± 6,89		83,4 ± 9,6	44,7 ± 15,8
D ₃	40,4 ± 14,5			
D ₄		41,5 ± 4,45		109 ± 39
D ₅	1,18 ± 0,40			7,5 ± 0,3

Tabelle D-13 Affinitätsdaten des LE300, aus Bonner und Jenaer Radioligandbindungsexperimenten

Dem betrachteten D₁ Rezeptor sehr ähnlich ist der zur gleichen Rezeptorfamilie gehörige D₅ Rezeptor. Aufgrund der hohen Homologie der beiden Rezeptoren der D₁ Familie existieren kaum subtypselektive Liganden.

Von den besprochenen D₁ selektiven Verbindungen zeigt keine eine Überlegenheit in ihrer D₁ Affinität, verglichen mit der D₅ Affinität. Unter allen getesteten Substanzen besitzen lediglich drei Verbindungen Affinitätsunterschiede um mindestens eine Zehnerpotenz zwischen D₁ und D₅ Rezeptor (siehe Tabelle D-14). Wobei das amino- und hydroxysubstituierte Dibenzazecin PM98 gegenüber dem D₅ Rezeptor eine 24-fach höhere D₁ Affinität aufweist, allerdings bei einer nur 4-fachen D₁/D₂ Selektivität. Die 11-methoxylierte und am Indolstickstoff methylierte Benzindoloverbindung SM und das 3-methoxylierte Oxazacycloundecan WW60 zeigen eine 10- bzw. 20-fach höhere Affinität zum D₅ Rezeptor als zum D₁ Rezeptor. Die Bindungsexperimente am 5-HT_{2A} Rezeptor ergaben für das erwähnte Benzindoloderivat SM eine herausragende subnanomolare Affinität (K_i = 0,02nM), so dass zusätzlich zur besprochenen D₁/D₅ Selektivität auch die D₁/5-HT_{2A} und D₂/5-HT_{2A} Selektivitäten bemerkenswert hoch sind. Das Oxazacycloundecan WW60 verfügt außer der 20-fachen D₁/D₅ Selektivität auch über eine gegenüber dem D₂ Rezeptor 24-fach höhere Affinität zum 5-HT_{2A} Rezeptor.

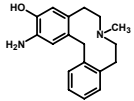
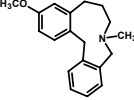
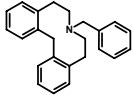
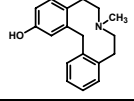
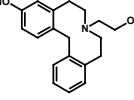
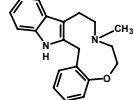
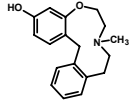
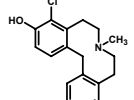
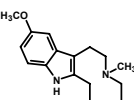
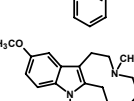
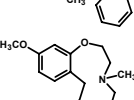
Code	Struktur	D ₂ /D ₁	D ₅ /D ₁	D ₁ /5-HT _{2A}	D ₂ /5-HT _{2A}
PM98		4,01	24,35	0,14	0,55
CE5A0		7,91	7,91	0,29	2,28
PM65a		1,11	6,00	2,80	3,12
PM77		5,95	5,80	5,90	35,10
PM92		10,89	0,22	2,32	25,23
FM7		0,07	0,18	5,06	0,35
WW84		85,63	0,18	0,99	84,57
PM83		4,82	0,13	0,71	3,43
CE550		17,07	0,12	2,32	39,68
SM		0,90	0,10	92,91	83,88
WW60		4,45	0,05	5,44	24,22

Tabelle D-14 subtypeselektive Verbindungen bezogen auf die D₅/D₁ Affinität, grün markiert: mehr als 10-facher Affinitätsunterschied

Bei Betrachtung der D₁/5-HT_{2A} Affinitätsverhältnisse (siehe Anhang, Tabelle 3) lässt sich feststellen, dass ein großer Teil der untersuchten Azecinderivate keine nennenswerten Affinitätsunterschiede an diesen Rezeptoren zeigt. Nur 9 der 50 untersuchten Verbindungen haben gegenüber dem D₁ Rezeptor eine mindestens 10-fache oder höhere Affinität zum 5-HT_{2A} Rezeptor (siehe Tabelle D-15). Auffallend ist, dass sechs dieser im Vergleich zum D₁ Rezeptor 5-HT_{2A} selektiven Verbindungen Benzindoloderivate darstellen und nur drei Verbindungen vom Dibenztyp darunter sind, obwohl insgesamt 39 Dibenz- aber nur 10 Benzindoloderivate untersucht wurden.

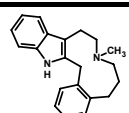
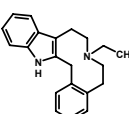
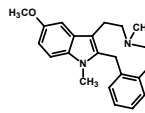
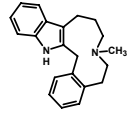
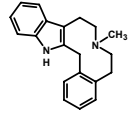
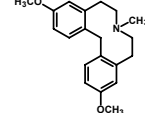
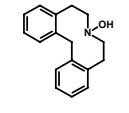
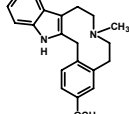
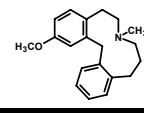
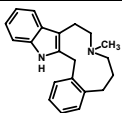
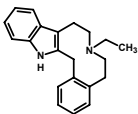
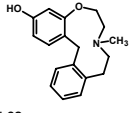
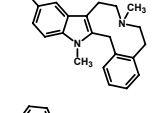
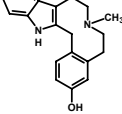
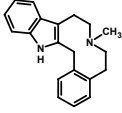
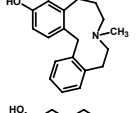
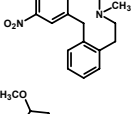
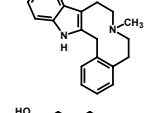
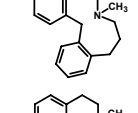
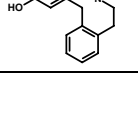
Code	Struktur	D ₂ /D ₁	D ₅ /D ₁	D ₁ /5-HT _{2A}	D ₂ /5-HT _{2A}
CE560		6,58	0,53	140,22	922,83
LE301		9,04	0,41	98,25	887,72
SM		0,90	0,10	92,91	83,88
CE580		0,41	0,63	30,84	12,65
LE300		3,20	0,41	21,99	70,33
PM154		0,69	2,38	13,72	9,42
PM22-3		1,20	0,72	12,53	15,07
CE500		1,50	2,40	12,06	18,06
CE530		0,82	0,46	9,81	8,03

Tabelle D-15 Verbindungen mit D₁/5-HT_{2A} Selektivität um mindestens eine Zehnerpotenz

Besonders interessant ist das Verhältnis der 5-HT_{2A} Affinitäten zu den Dopamin D₂ Affinitäten, da das D₂/5-HT_{2A} Profil laut der von Meltzer et al. aufgestellten „Serotonin-Dopamin“-Hypothese [Meltzer, 1989] (siehe Abschnitt A.1.4) einen wichtigen Anhaltspunkt für eine potentielle atypische antipsychotische Wirkung darstellt. Clozapin und andere als atypisch geltende Neuroleptika besitzen unter anderem Affinitäten zu 5-HT_{2A} und D₂ Rezeptoren, wobei jeweils die D₂ Affinität deutlich schwächer ausgeprägt ist als die 5-HT_{2A} Affinität [Meltzer, 1989; Meltzer, 2004; Meltzer, Huang, 2008]. Hinsichtlich der Funktionalität handelt es sich dabei um antagonistische Aktivitäten.

Die Untersuchung der Azecinderivate und deren Homologen im Hinblick auf ihr D₂/5-HT_{2A} Affinitätsverhältnis zeigt für 26 der 50 untersuchten Verbindungen eine mindestens 10-fache Überlegenheit der 5-HT_{2A} Affinität gegenüber der D₂ Affinität (siehe Anhang Tabelle 4). Tabelle D-16 zeigt alle Verbindungen mit deutlichem Affinitätsunterschied zwischen 5-HT_{2A} und D₂ Rezeptoren, darunter alle Indolderivate, bis auf die Bisindoloverbindung MI506 und das Oxazaderivat FM7, sowie 17 der 39 untersuchten Dibenzderivate.

Bezüglich der Funktionalität wurde für einen Großteil der Verbindungen in Calcium-Fluoreszenz-Experimenten eine antagonistische Aktivität am D₂ Rezeptor nachgewiesen (siehe Tabelle D-4 und [Kassack et al., 2002b; Hoefgen et al., 2006; Enzensperger, Lehmann, 2006; Mohr et al., 2006; Enzensperger et al., 2007b]), während zur Funktionalität der Verbindungen am 5-HT_{2A} Rezeptor bisher nur wenige Daten aus dem Calcium Assay zu Verfügung stehen. Weitere Experimente werden jedoch derzeit durchgeführt. In Experimenten an 5-HT_{2A} Rezeptoren von porcinen Koronararterien wurden antagonistische Aktivitäten der Leitstruktur LE300 und weiterer Azecinderivate beobachtet [Enzensperger et al., 2008]. Auch in anderen funktionellen Experimenten wurde die antagonistische Aktivität des Benzindoloazecins LE300 am 5-HT_{2A} Rezeptor festgestellt [Rostom et al., 2001; El Subbagh et al., 2002; Decker et al., 2004]

Code	Struktur	D ₂ /D ₁	D ₅ /D ₁	D ₁ /5-HT _{2A}	D ₂ /5-HT _{2A}
CE560		6,58	0,53	140,22	922,83
LE301		9,04	0,41	98,25	887,72
WW84		85,63	0,18	0,99	84,57
SM		0,90	0,10	92,91	83,88
CE501		29,39	2,35	2,64	77,68
LE300		3,20	0,41	21,99	70,33
CE521		37,37	0,99	1,81	67,76
FS3		14,26	1,16	3,78	53,94
CE550		17,07	0,12	2,32	39,68
CE571		6,40	4,21	5,74	36,75
PM77		5,95	5,80	5,90	35,10

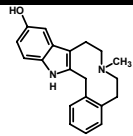
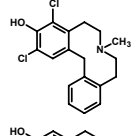
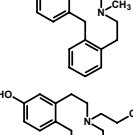
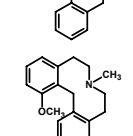
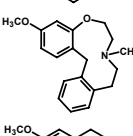
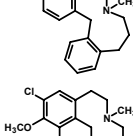
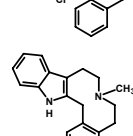
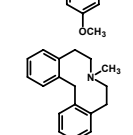
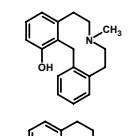
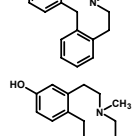
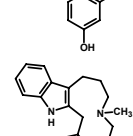
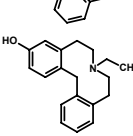
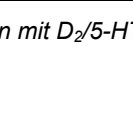

Code	Struktur	D ₂ /D ₁	D ₅ /D ₁	D ₁ /5-HT _{2A}	D ₂ /5-HT _{2A}
CE551		80,67	0,71	0,39	31,81
PM124		27,50	0,59	1,06	29,14
LE404		44,49	3,81	0,59	26,32
PM92		10,89	0,22	2,32	25,23
PM145		21,72	1,53	1,15	24,95
WW60		4,45	0,05	5,44	24,22
CE570		6,00	0,32	3,79	22,72
PM58		11,34	0,75	1,66	18,84
CE500		1,50	2,40	12,06	18,06
LE410		12,56	2,49	1,32	16,52
PM148		9,66	0,54	1,69	16,37
PM22-3		1,20	0,72	12,53	15,07
PM153		28,89	0,82	0,48	13,84
CE580		0,41	0,63	30,84	12,65
PM78		21,19	1,87	0,52	11,10

Tabelle D-16 Verbindungen mit D₂/5-HT_{2A} Affinitätsunterschieden um mindestens eine Zehnerpotenz

D.4.1.3 Untersuchung der Korrelation von 5-HT_{2A} Affinität und Dopaminrezeptoraffinitäten

Enzensperger verglich 5-HT_{2A} Aktivitäten von 13 Azecinderivaten, die mit Hilfe von Organbadexperimenten gewonnen wurden, mit D₁ und D₂ Dopaminrezeptoraffinitäten aus Radioligandbindungsexperimenten. Dabei stellte sich heraus, dass die 5-HT_{2A} Aktivitäten in höherem Maße mit den D₁ Affinitäten als mit den D₂ Affinitäten korrelieren [Enzensperger et al., 2008]. Die Korrelation der 5-HT_{2A}/D₁ Daten ergab einen R²-Wert von 0,5415 gegenüber R² = 0,3178 als Ergebnis der 5-HT_{2A}/D₂ Gegenüberstellung.

Der Korrelationskoeffizient R (Pearson R) ist ein Maß für den Grad und die Richtung des Zusammenhangs zwischen den untersuchten Parametern. Besteht ein funktionaler linearer Zusammenhang, so nimmt der Korrelationskoeffizient den Wert 1 oder -1 an. R = 0 bedeutet, dass die untersuchten Variablen voneinander unabhängig sind. Eine Abhängigkeit wird also immer wahrscheinlicher, je mehr sich R dem Wert 1 oder -1 annähert. Statt des Korrelationskoeffizienten R, wird auch das Bestimmtheitsmaß R² (R squared) angegeben. Je näher das Bestimmtheitsmaß R² an 1 liegt, umso höher ist die Wahrscheinlichkeit eines linearen Zusammenhangs.

Stellt man die im Rahmen dieser Arbeit aus Radioligandbindungsexperimenten gewonnenen 5-HT_{2A} Affinitäten den Dopaminaffinitäten gegenüber (siehe Tabelle D-17), kann die von Enzensperger gefundene Tendenz ebenfalls beobachtet werden. Allerdings ist der Unterschied zwischen 5-HT_{2A}/D₁ und 5-HT_{2A}/D₂ Korrelation geringer ausgeprägt. Die Korrelation zu den weiteren Rezeptoren der D₂ Familie (D₃ und D₄) liegt in einem ähnlichen Bereich, wie die 5-HT_{2A}/D₂ Korrelation. Auch innerhalb der D₁ Familie (D₁ und D₅) sind ähnliche Zusammenhänge zu beobachten. Werden nur die Dibenzderivate betrachtet (siehe Tabelle D-18), so ist sowohl bei den D₁ als auch bei den Rezeptoren der D₂ Familie, eine stärkere Beziehung zwischen 5-HT_{2A}- und Dopaminrezeptoraffinitäten als bei der Gesamtheit der Azecinderivate zu beobachten. Wobei die 5-HT_{2A}/D₁ Affinitäten mit einem R² Wert von 0,7023 den stärksten Zusammenhang zeigen. Interessanterweise bewegt sich der 5-HT_{2A}/D₅ Zusammenhang (R² = 0,5621) hier nicht in der gleichen Größenordnung wie die 5-HT_{2A}/D₁ Korrelation, sondern ist gegenüber der Korrelation aller Azecinderivate kaum angestiegen. Die Untersuchung der 5-HT_{2A} Affinitäten der Indolderivate bezüglich einer Korrelation zu den Dopaminrezeptoraffinitäten lässt zu den D₁, D₂ und D₃ Affinitäten keine signifikanten Zusammenhänge und im Hinblick auf die D₄ und D₅ Affinitäten nur einen schwachen Zusammenhang von mäßiger Signifikanz erkennen (siehe Tabelle D-19). In die Korrelationsanalysen wurden nur Verbindungen mit submikromolaren und besseren Affinitäten zum 5-HT_{2A} Rezeptor einbezogen - damit wurden 47 von 50 Verbindungen erfasst. Die Einbeziehung einiger wenig affiner Verbindungen würde die Korrelation erheblich verfälschen und zu bedeutend höheren R²-Werten führen.

Parameter	5-HT _{2A} /D1	5-HT _{2A} /D2	5-HT _{2A} /D3	5-HT _{2A} /D4	5-HT _{2A} /D5
Number of XY Pairs	47	47	47	47	46
Pearson r	0.7438	0.6715	0.6604	0.6639	0.7398
95% confidence interval	0.5805 to 0.8495	0.4761 to 0.8037	0.4605 to 0.7965	0.4654 to 0.7988	0.5724 to 0.8480
P value (two-tailed)	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001
P value summary	***	***	***	***	***
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
R squared	0.5532	0.4509	0.4361	0.4408	0.5473

Tabelle D-17 Korrelationsanalysen aller untersuchten Azecinderivate mit mindestens submikromolarer Affinität am 5-HT_{2A} Rezeptor (ohne PM22b, CE5A0 und CE5A1), zugehörige Streudiagramme siehe Abbildung 1 im Anhang

Parameter	5-HT _{2A} /D1	5-HT _{2A} /D2	5-HT _{2A} /D3	5-HT _{2A} /D4	5-HT _{2A} /D5
Number of XY Pairs	36	36	36	36	35
Pearson r	0.8381	0.7377	0.7469	0.7526	0.7497
95% confidence interval	0.7031 to 0.9147	0.5399 to 0.8582	0.5544 to 0.8636	0.5632 to 0.8668	0.5551 to 0.8665
P value (two-tailed)	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001
P value summary	***	***	***	***	***
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
R squared	0.7023	0.5441	0.5579	0.5663	0.5621

Tabelle D-18 Korrelationsanalysen aller untersuchten Dibenzderivate mit mindestens submikromolarer Affinität am 5-HT_{2A} Rezeptor (ohne PM22b, CE5A0 und CE5A1), zugehörige Streudiagramme siehe Abbildung 2 im Anhang

Parameter	5-HT _{2A} /D1	5-HT _{2A} /D2	5-HT _{2A} /D3	5-HT _{2A} /D4	5-HT _{2A} /D5
Number of XY Pairs	11	11	11	11	11
Pearson r	0.4904	0.4119	0.5586	0.6226	0.6169
95% confidence interval	-0.1553 to 0.8425	-0.2498 to 0.8114	-0.06224 to 0.8678	0.03616 to 0.8901	0.02679 to 0.8881
P value (two-tailed)	0.1257	0.2081	0.0741	0.0408	0.0432
P value summary	ns	ns	ns	*	*
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	No	No	No	Yes	Yes
R squared	0.2404	0.1697	0.3120	0.3877	0.3805

Tabelle D-19 Korrelationsanalysen aller untersuchten Indolinderivate, zugehörige Streudiagramme siehe Abbildung 3 im Anhang

D.4.1.4 Einfluss der Hydroxy- und Methoxysubstitution auf die 5-HT_{2A}, D₁ und D₂ Affinitäten

Mohr und Enzensperger untersuchten bereits Einflüsse der Hydroxy- und Methoxysubstitution von Dibenz- und Benzindoloderivaten auf die Dopaminrezeptoraffinitäten und stellten fest, dass hydroxylierte Dibenzderivate und am Benzol in 3-Stellung hydroxylierte Benzindoloderivate besonders hinsichtlich ihrer D₁ Affinität den methoxylierten Derivaten überlegen sind, während bei den in 11-Stellung (am Indol) substituierte Benzindoloverbindungen keine Affinitätsunterschiede zwischen dem Hydroxy- und dem Methoxyderivat bestehen [Mohr, 2005; Enzensperger, 2007]. Allerdings steigerte, verglichen mit der unsubstituierten Leitstruktur LE300, sowohl die Hydroxy- als auch die Methoxysubstitution in 11-Stellung der Benzindoloderivate (CE551 und CE550) die Affinitäten zu den Rezeptoren der D₁ Familie [Enzensperger, 2007].

In Tabelle D-20 sind die 5-HT_{2A}, D₁ und D₂ Affinitäten der hydroxylierten Verbindungen den Affinitäten der analogen methoxylierten Verbindungen gegenübergestellt. Die Affinitäten der Hydroxydrivate sind grün unterlegt, wenn diese die jeweilige Affinität des analogen Methoxyderivates um mindestens das 5-fache übertreffen, im entgegengesetzten Fall (Affinität der Hydroxyverbindung ist mindestens 5-fach schlechter, als die der Methoxyverbindung) wurde der K_i-Wert rot markiert.

Sieben der 13 dargestellten Hydroxyverbindungen zeigen eine deutlich höhere (mindestens 5-fache) Affinität zum D₁ Rezeptor als deren Methoxyanaloge (D₁ Affinitäten grün unterlegt). Zusätzlich zu den markierten Substanzen besitzen auch die 11-gliedrigen Hydroxyverbindungen CE521 und CE531 eine höhere Affinität zum D₁ Rezeptor als die entsprechenden Methoxyderivate, allerdings ist deren Affinitätsunterschied schwächer ausgeprägt, als der der grün markierten Verbindungen. Alle der in ihrer D₁ Affinität den Methoxyderivaten überlegenen Moleküle enthalten eine Hydroxy-phenoxyethylamin- (WW84) oder Hydroxyphenylethylamin-Struktur. Die Hydroxysubstitution dieser Moleküle befindet sich entweder in 3-Stellung (LE404, PM78, PM153, CE501, WW84, CE571) oder, wie bei PM77 und CE531, in 2-Position.

Ist das Hydroxyphenylethylamin-haltige Molekül in 1-Position substituiert (PM148), so bestehen weder am D₁ Rezeptor, noch am 5-HT_{2A} oder D₂ Rezeptor Affinitätsunterschiede zwischen Hydroxy- und Methoxyderivat. Hydroxyverbindungen ohne Phenylethylaminteil (CE591 und CE5A1) zeigen am D₁ Rezeptor ebenfalls keinen Affinitätsunterschied zum Methoxyanalogon oder haben am D₁ Rezeptor eine etwas schlechtere Affinität als die Methoxyverbindung. Am 5-HT_{2A} Rezeptor sind nur drei der Hydroxyverbindungen den Methoxyanalogen in ihrer Affinität deutlich überlegen. Es handelt sich dabei ausschließlich um *N*-Methyldibenzderivate, die über genau eine Hydroxyphenylethyl-Teilstruktur verfügen und deren Hydroxygruppe sich in 3-Stellung des Moleküls befindet. Alle anderen Verbindungen zeigen am 5-HT_{2A} Rezeptor keinen Affinitätsunterschied zur analogen Methoxyverbindung oder sind geringer affin als das entsprechende Methoxyderivat.

Am D₂ Rezeptor sind nur bei drei Grundstrukturen Affinitätsunterschiede zu beobachten, wobei hier jeweils das Methoxyderivat der Hydroxyverbindung überlegen ist.

Affinitäten aus Radioligandbindungsexperimenten

K_i-Wert [nM] MW ± SEM bzw. Senkung der gebundenen Radioaktivität durch eine 10 µM Lösung der Testsubstanz

Hydroxyverbindungen					Methoxyverbindungen				
Code (weitere Chiffren)	Struktur	5-HT _{2A}	D ₁	D ₂	Code (weitere Chiffren)	Struktur	5-HT _{2A}	D ₁	D ₂
LE404 (LE-404) (44)		0,67 ± 0,04	0,39 ± 0,16	17,5 ± 1,50	PM20 (LE-PM-425) (128)		4,42 ± 1,27	23,4 ± 5,15	13,0 ± 9,00
PM78 (LE-PM-426) (129)		7,26 ± 0,71	3,80 ± 0,80	80,5 ± 20,6	PM53 (LE-PM-427) (130)		8,55 ± 0,28	33,0 ± 2,00	11,7 ± 1,30
PM77 (LE-PM-428) (131)		1,51 ± 0,58	8,92 ± 0,82	53,0 ± 1,00	PM40 (LE-PM-429) (132)		23,1 ± 0,15	82,0 ± 5,00	62,0 ± 5,00
PM148 (LE-PM-449) (153)		5,14 ± 0,09	8,70 ± 2,00	84,1 ± 2,75	PM145 (LE-PM-448) (152)		6,57 ± 1,36	7,55 ± 1,45	164 ± 12,0
PM153 (LE-PM-451) (155)		4,25 ± 0,17	2,03 ± 0,91	58,7 ± 9,35	PM154 (LE-PM-453) (157)		0,69 ± 0,08	9,40 ± 1,00	6,45 ± 0,15
CE501 (LE-CE-501) (End2) (195)		1,40 ± 0,27	3,70 ± 1,10	109 ± 15,3	CE500 (LE-CE-500) (End1) (194)		1,58 ± 0,23	19,0 ± 2,30	28,45 ± 6,04
CE551 (LE-CE-551) (175)		1,42 ± 0,25	0,56 ± 0,06	45,2 ± 8,24	CE550 (LE-CE-550) (174)		0,36 ± 0,10	0,83 ± 0,06	14,1 ± 2,75
WW84 (LE-WW-451) (114)		3,24 ± 0,83	3,20 ± 0,80	274 ± 0,50	WW60 (LE-WW-450) (113)		6,52 ± 1,60	35,5 ± 11,7	158 ± 38,0
CE521 (LE-CE-521) (164)		7,70 ± 1,57	14,0 ± 2,04	522 ± 182	CE520 (LE-CE-520) (163)		5,14 ± 1,60	29,5 ± 6,36	24,4 ± 0,30
CE571 (LE-CE-571) (185)		0,56 ± 0,06	3,23 ± 1,71	20,7 ± 4,30	CE570 (LE-CE-570) (183)		3,83 ± 0,71	14,5 ± 3,50	87,0 ± 9,00
CE531 (LE-CE-531) (170)		6,34 ± 0,63	59,6 ± 13,8	33,0 ± 12,0	CE530 (LE-CE-530) (169)		13,9 ± 2,00	136 ± 9,11	112 ± 18,5
CE591 (LE-CE-591) (192)		118 ± 42,0	80,1 ± 48,0	383 ± 7,50	CE590 (LE-CE-590) (191)		22,0 ± 4,60	23,5 ± 11,7	172 ± 5,00
CE5A1 (280)		<60%	2071 ± 76,5	<60%	CE5A0 (MM75Me) (279)		4383 ± 45,5	1265 ± 166	<60%

	Affinität: hydroxy > methoxy (mindestens 5-fach)
	Affinität: hydroxy < methoxy (mindestens 5-fach)

Tabelle D-20 Vergleich der 5-HT_{2A}, D₁ und D₂ Affinitäten von hydroxylierten und analogen methoxylierten Verbindungen

D.4.1.5 Bindungseigenschaften der Oxazacycloundecane im Vergleich mit den sauerstofffreien Analogen

Wittig untersuchte die sauerstoffhaltigen Dibenzderivate WW84 und WW60 (siehe Tabelle D-21) bereits an Dopaminrezeptoren und stellte eine gegenüber den sauerstofffreien Analoga erhöhte Affinität zum D₅ Rezeptor fest. Die Methoxyverbindung WW60 besitzt von allen bisher untersuchten Azecin- und Homoazecinderivaten mit einer gegenüber dem D₁ Rezeptor 20-fach höheren Affinität zum D₅ Rezeptor die stärkste D₁/D₅ Selektivität.

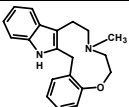
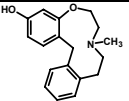
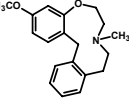
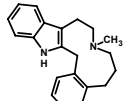
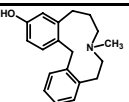
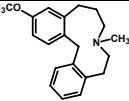
Code (weitere Chiffren)	Struktur	Affinitäten aus Radioligandbindungsexperimenten						Ergebnisse des Calcium Assays			
		K _i -Wert [nM] MW ± SEM bzw. Senkung der gebunden Radioaktivität durch eine 10µM Lösung der Testsubstanz						Antagonist (AN): K _i -Wert [nM] Agonist (AG): EC ₅₀ -Wert [nM] MW ± SEM			
		5-HT _{2A}	D ₁	D ₅	D ₂	D ₃	D ₄	D ₁	D ₅	D ₂	D ₃
FM7 (267)		6,11 ± 0,03	30,9 ± 1,07	5,68 ± 1,84	2,15 ± 0,04	125 ± 24,0	1661 ± 554	n.b.	AN 38,5 ± 10,5	n.b.	AN 79
WW84 (LE-WW-451) (114)		3,24 ± 0,83	3,20 ± 0,80	0,57 ± 0,10	274 ± 0,50	1384 ± 454	375 ± 106	AN 7,33	AN 4,52 ± 1,92	AN 159	n.b.
WW60 (LE-WW-450) (113)		6,52 ± 1,60	35,5 ± 11,7	1,80 ± 0,20	158 ± 38,0	1601 ± 306	546 ± 110	AN 27,4	AN 19,4	AN 14,0	n.b.
CE560 (LE-CE-560) (179)		0,02 ± 0,01	2,15 ± 0,65	1,15 ± 0,56	14,2 ± 4,15	278 ± 75,5	134 ± 35,8	AN 1,60 ± 0,20	AN 2,85 ± 0,85	AN 1,26 ± 0,09	n.b.
CE521 (LE-CE-521) (164)		7,70 ± 1,57	14,0 ± 2,04	13,8 ± 6,57	522 ± 182	6120 ± 1802	962 ± 186	AN 39,1 ± 11,0	AN 11,7 ± 1,03	AN 353 ± 12,0	n.b.
CE520 (LE-CE-520) (163)		5,14 ± 1,60	29,5 ± 6,36	66,4 ± 4,64	24,4 ± 0,30	3136 ± 625	1488 ± 36,5	AN 222 ± 29,5	AN 48,1 ± 1,85	AN 25,0 ± 0,45	n.b.

Tabelle D-21 Bindungseigenschaften der Oxazacycloundecane und der sauerstofffreien Analogen

Auch das im Rahmen dieser Arbeit synthetisierte sauerstoffhaltige Benzindoloderivat FM7 zeigt, wie das Hydroxydibenzoderivat WW85 eine D₁/D₅ Selektivität um den Faktor 5 (siehe auch Tabelle D-14), während bei der sauerstofffreien analogen Verbindung CE560 keine D₁/D₅ Selektivität zu beobachten ist. Bei weiterer Betrachtung des Bindungsprofils des Benzindoloderivats FM7 fällt auf, dass es zum D₂ Rezeptor eine 14-fach höhere Affinität aufweist, als zum D₁ Rezeptor. Das sauerstofffreie Analogon dagegen zeigt die für Azecine und Homoazecine klassische Selektivität zu D₁ Familie (siehe auch Abschnitt D.4.1.2).

Die Analyse der 5-HT_{2A} Affinitäten lässt bei den Dibenzderivaten keinen Affinitätsunterschied zwischen sauerstofffreien Verbindungen und Oxaanalogen erkennen, wogegen sich die 5-HT_{2A} Affinitäten der Indolderivate deutlich unterscheiden (siehe Tabelle D-21). Die

Einführung des elektronegativen Sauerstoffs in den, bis dahin lipophilen Phenylpropylamin-teil des Moleküls geht mit einem klaren Affinitätsverlust einher.

D.4.2 Bindungsverhalten rigider Synthesevorstufen ringerweiterter

Homologer der Azecine und Affinitäten offenkettiger Analoga mit gesteigerter Flexibilität

Die Synthese der in Abschnitt D.4.1 diskutierten am 5-HT_{2A} und den Dopaminrezeptorsubtypen affinen Diarylazecine und deren Homologen erfolgt über eine tetracyclische (Dibenzderivate) bzw. pentacyclische (Benzindoloderivate) Chinolizin- oder Homochinolizinstufe, deren zentrale C-N-Bindung anschließend mit einem geeigneten Verfahren gespalten wird. Einige dieser synthetischen Vorstufen (siehe Abbildung D-9) wurden auf ihre Bindungseigenschaften an 5-HT_{2A} Rezeptoren und den Dopaminrezeptorsubtypen untersucht. Außer bei Verbindung CE572, welche eine 3-Methoxyphenylethylamin-Struktur enthält, waren keine Affinitäten zu beobachten. Tabelle D-22 zeigt das Bindungsprofil der affinen Dibenzverbindung. Die Substanz besitzt zum 5-HT_{2A} Rezeptor eine submikromolare Affinität, während die Affinitäten zu den Rezeptoren der D₁ Familie im mikromolaren Bereich liegen und zur D₂ Familie keine Affinität zu beobachten ist.

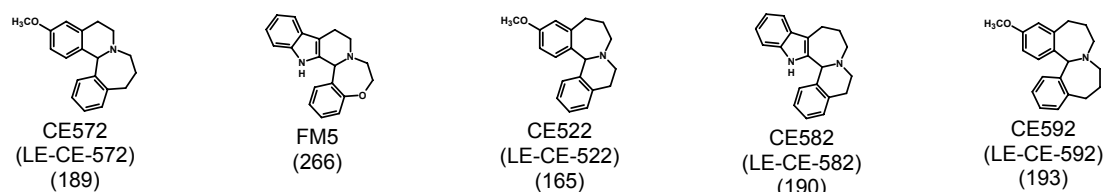


Abbildung D-9 am 5-HT_{2A} Rezeptor und den Dopaminrezeptorsubtypen untersuchte Chinolizin- und Homochinolizinderivate

Code (weitere Chiffren)	Affinitäten aus Radioligandbindungsexperimenten						Ergebnisse des Calcium Assays			
	K _i -Wert [nM] MW ± SEM bzw. Senkung der gebundenen Radioaktivität durch eine 10µM Lösung der Testsubstanz						Antagonist (AN): K _i -Wert [nM] Agonist (AG): EC ₅₀ -Wert [nM] MW ± SEM			
	5-HT _{2A}	D ₁	D ₅	D ₂	D ₃	D ₄	D ₁	D ₅	D ₂	D ₃
CE572 (LE-CE-572) (189)	736 ± 60,5	4160	3384 ± 464	<60%	<60%	<60%	AN 1650	n.a.	n.a.	n.b.

Tabelle D-22 Bindungsdaten des tetracyclischen Dibenzderivates CE572

Ferner wurden fünf quartäre N-Methylverbindungen (siehe Abbildung D-10) untersucht, deren Ringspaltung unter Birch-Bedingungen (siehe Abschnitt B.1) zu den in Abschnitt D.4.1 diskutierten Zielverbindungen mit 11-gliedrigen Zentralring führt. Die quartären Salze erwiesen sich in Radioligandbindungsstudien am 5-HT_{2A} Rezeptor als ebenso unwirksam wie an den Dopaminrezeptoren. Die, gegenüber den größtenteils inaktiven Synthesevorstufen, deutlich höhere Flexibilität, der in Abschnitt D.4.1 diskutierten Zielverbindungen mit

zentralem 11- oder 12-Ring, ist demnach essentiell für eine Affinität zu 5-HT_{2A} Rezeptoren und den Dopaminrezeptorsubtypen.

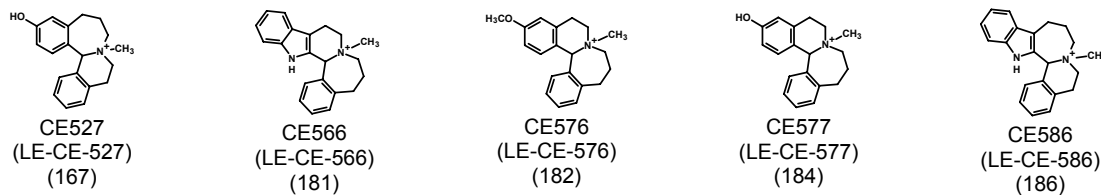


Abbildung D-10 am 5-HT_{2A} Rezeptor und den Dopaminrezeptorsubtypen untersuchte quartäre Verbindungen

Für Verbindungen, die Partialstrukturen der Diarylazecine und deren Homologen besitzen und deren Flexibilität durch formale Öffnung des zentralen Rings weiter erhöht ist (siehe Verbindungen in Tabelle D-23), wären demzufolge ebenfalls interessante Affinitäten an 5-HT_{2A} Rezeptoren und Dopaminrezeptoren zu erwarten.

Wie den, in Tabelle D-23 dargestellten Ergebnissen zu entnehmen ist, geht jedoch eine weitere Abnahme der Rigidität eher mit einem Affinitätsverlust einher. Ein Grund für die relativ schwachen Affinitäten der offenkettigen Analoga könnte die fehlende *N*-Methylsubstitution sein, welche sich für die Bindungseigenschaften der Diarylazecine und deren Homologen als vorteilhaft erwiesen hat (siehe Abschnitt D.4.1.)

Code (weitere Chiffren)	Struktur	Affinitäten aus Radioligandbindungsexperimenten							Ergebnisse des Calcium Assays			
		K _i -Wert [nM] MW ± SEM bzw. Senkung der gebunden Radioaktivität durch eine 10µM Lösung der Testsubstanz							Antagonist (AN): K _i -Wert [nM] Agonist (AG): EC ₅₀ -Wert [nM] MW ± SEM			
		5-HT _{2A}	D ₁	D ₅	D ₂	D ₃	D ₄		D ₁	D ₅	D ₂	D ₃
WW33 (LE-WW-454) (117)		110 ± 8,50	379 ± 157	n.b.	<60%		1818 ± n.b.		n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
PM126 (LE-PM-444) (148)		428 ± 68,5	365 ± 26,5	376 ± 75,5	2460 ± 1631	6910 ± 708	282 ± 50,5		AN 917 ± 76,5	AN 1074	AN 550	n.b.
CE544 (LE-CE-544) (188)		3448 ± 511	<60%	n.b.	<60%	<60%	<60%		AN 1541 ± 190	n.a.	n.a.	n.b.
PM127 (LE-PM-445) (149)		5045 ± 773	<60%	<60%	n.b.	2554 ± 1390	626 ± 217		AN 798	AN 901	AN 95,5	n.b.

Tabelle D-23 am 5-HT_{2A} Rezeptor und den Dopaminrezeptorsubtypen untersuchte offenkettige Analoga

D.4.3 Arylpiperazinderivate

Die Calcium-Fluoreszenz-Messungen der Arylpiperazine an den verschiedenen Dopaminrezeptorsubtypen zeigten eine antagonistische Aktivität aller Verbindungen (siehe Tabelle D-5). Dopaminrezeptoragonismus ließ sich bei keiner Verbindung beobachten. Im Folgenden soll auf die Affinitätsdaten aus den Radioligandbindungsexperimenten eingegangen werden.

D.4.3.1 Arylpiperazinderivate mit Lactamfunktion

Es wurde ein Satz von 16 Arylpiperazinen untersucht, in denen jeweils ein heteroaromatisches System über eine Butylkette mit einem Arylpiperazinteil verknüpft ist. Die Verbindungen unterscheiden sich in den verwendeten Heterocyclen und der Substitution des Phenylrestes. Die Ergebnisse der Radioligandbindungsstudien sind in Tabelle D-24 zusammengefasst. In Abbildung D-11 sind die Strukturen und Ergebnisse graphisch dargestellt. In einem Diagramm wurden jeweils vier Verbindungen zusammengestellt, die den gleichen Heterocyclen tragen. Diese Verbindungen sind in jedem Diagramm nach ihrer Phenylsubstitution in der Reihenfolge Methoxy, Chlor, Trifluormethyl und unsubstituierter Phenylring geordnet. Alle Verbindungen zeigten eine mindestens mikromolare Affinität zu den Dopaminrezeptorsubtypen und dem 5-HT_{2A} Rezeptor. Verbindungen, die im Grobscreening weniger als 60% des Radioliganden verdrängten, wurden an dem jeweiligen Rezeptor nicht weiter vermessen.

Substanzcode (weitere Chiffren)	K _i -Wert [nM] aus Radioligandbindungsexperimenten					
	MW ± SEM					
	5-HT _{2A}	D ₁	D ₅	D ₂	D ₃	D ₄
AHA-F5 (203)	1041 ± 88,5	1596 ± 52,0	1629 ± 216	38,2 ± 1,80	65,6 ± 4,00	178 ± 22,5
AHA-F6 (204)	109 ± 5,00	586 ± 189	230 ± 15,0	177 ± 57,5	287 ± 42,5	35,6 ± 9,29
AHA-F7 (205)	243 ± 69,5	815 ± 197	273 ± 74,9	113 ± 11,0	149 ± 65,9	<60%
AHA-F8 (206)	275 ± 30,0	1271 ± 138	1132 ± 30,0	360 ± 30,5	187 ± 33,0	78,8 ± 18,3
AHA-F13 (211)	<60%	<60%	<60%	41,2 ± 6,80	527 ± 227	81,2 ± 25,8
AHA-F14 (212)	186 ± 17,5	<60%	507 ± 55,6	140 ± 71,5	1780 ± 161	158 ± 29,3
AHA-F15 (213)	504 ± 123	1634 ± 51,0	1703 ± 44,0	72,7 ± 8,65	102 ± 13,3	185 ± 56,8
AHA-F16 (214)	280 ± 36,5	1971 ± 763	<60%	184 ± 14,0	306 ± 8,50	91,7 ± 21,1
AHA-F17 (215)	757 ± 0,50	482 ± 53,0	313 ± 47,0	162 ± 13,5	79,5 ± 26,5	4,20 ± 1,80
AHA-F18 (216)	294 ± 34,5	744 ± 187	202 ± 95,0	1747 ± 118	1204 ± 384	23,9 ± 5,80
AHA-F19 (217)	213 ± 37,0	361 ± 34,5	190 ± 5,00	323 ± 19,5	247 ± 42,7	28,4 ± 13,3
AHA-F20 (218)	314 ± 56,5	632 ± 128	330 ± 35,5	405 ± 91,0	195 ± 29,5	9,55 ± 0,85
AHA-F21 (219)	6939 ± 252	183 ± 91,5	80,2 ± 7,20	189 ± 41,8	36,0 ± 6,50	216 ± 56,0
AHA-F22 (220)	467 ± 61,5	123 ± 15,0	33,6 ± 2,80	760 ± 118	660 ± 150	142 ± 18,0
AHA-F23 (221)	654 ± 14,5	507 ± 32,0	80,8 ± 5,00	387 ± 1,50	13,6 ± 3,22	462 ± 67,5
AHA-F24 (222)	n.b.	n.b.	75,4 ± 21,2	319	30,1 ± 17,4	134 ± 21,5

Tabelle D-24 Radioligandbindungsdaten der Arylpiperazine mit Lactamfunktion (Auszug aus Tabelle D-5)

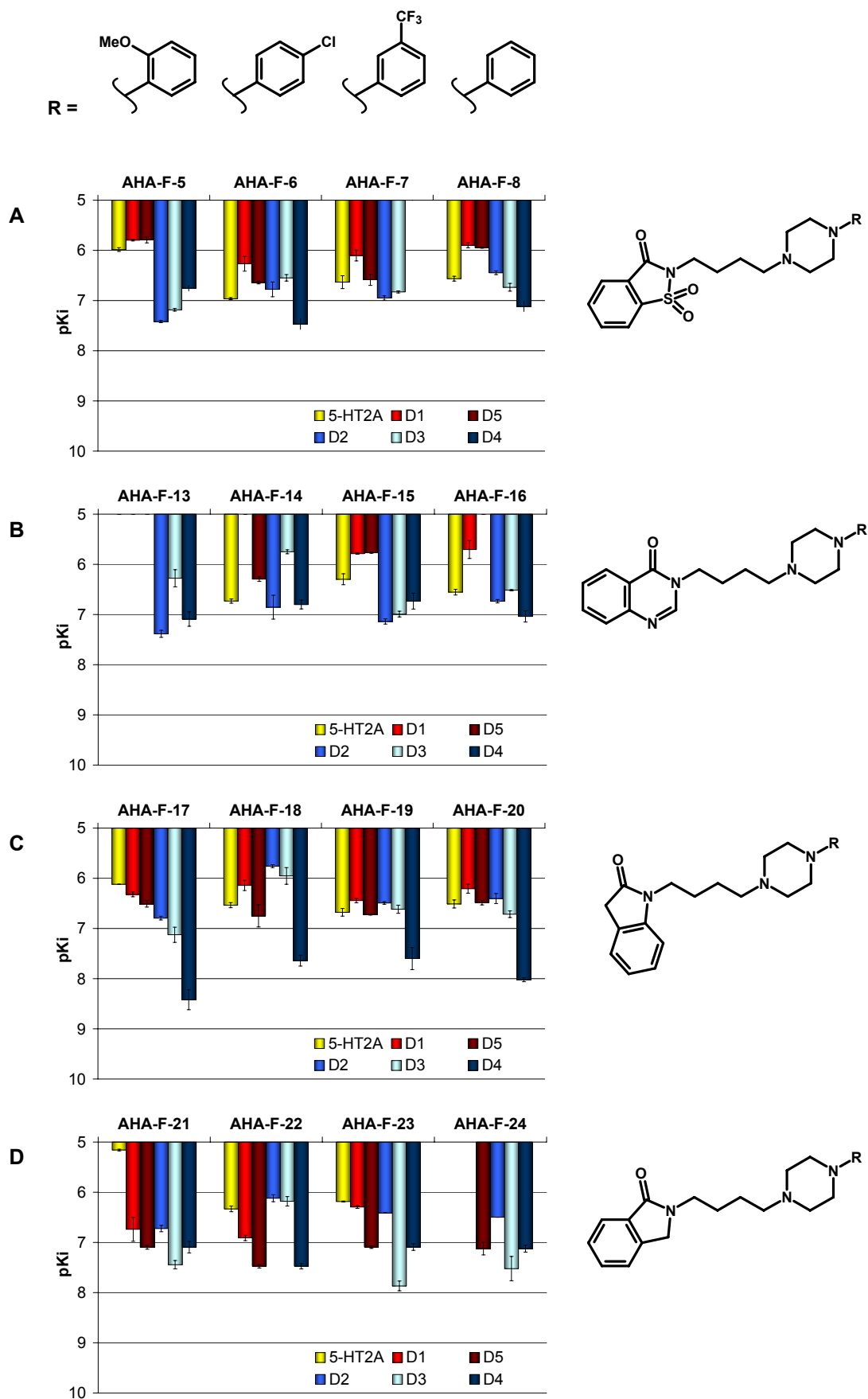


Abbildung D-11 Radioligandbindungsdaten der Arylpiperazine mit Lactamfunktion

Aus der Literatur sind D₃ selektive Verbindungen ähnlichen Aufbaus bekannt (Abbildung A-9). Diese Verbindungen besitzen allerdings eine exocyclische Amidfunktion in Form des Butylamidspacers. Die untersuchten Substanzen enthalten die Heterocyklen Saccharin, Chinazolinon, Indolinon und Isoindolinon, die man als cyclische Amide betrachten kann. Eine D₃ Selektivität ist bei den untersuchten Arylpiperazinderivaten mit cyclischer Amidfunktion, außer bei den Isoindolinonderivaten AHA-F21, AHA-F23 und AHA-F24, nicht zu beobachten. Das exocyclische Amid scheint also für die bevorzugte Bindung am D₃ Rezeptor eine gewisse Bedeutung zu besitzen. Ähnliche Verbindungen, deren Struktur aus einem cyclischen Benzamid und verschiedenen Arylpiperazinresten besteht, die über eine 4-gliedrige Kohlenstoffkette verknüpft sind, wurden als potentielle atypische antipsychotische Wirkstoffe mit 5-HT_{2A}/D₂ Antagonismus beschrieben [Norman et al., 1994; Norman et al., 1996a; Norman et al., 1996b]. Dieses Bindungsprofil (leichter D₂ und stärkerer 5-HT_{2A} Antagonismus) kann an den untersuchten Verbindungen, mit Ausnahme des Indolinonderivats AHA-F18, nicht beobachtet werden. Die Verbindung AHA-F18 hat am 5-HT_{2A} Rezeptor einen K_i-Wert von 294nM und am D₂ Rezeptor eine schwächere Affinität von 1747nM. Allerdings wird die 5-HT_{2A} Affinität noch von der D₅ (K_i = 202nM) und D₄ (K_i = 24nM) Affinität übertroffen. Die D₄ Affinität der Verbindung AHA-F18 übertrifft die Affinitäten zu den anderen untersuchten Rezeptoren um ein bis zwei Zehnerpotenzen. Man kann hier von einer D₄ Selektivität sprechen. Auch die Indolinonderivate AHA-F17, AHA-F19 und AHA-F20 binden bevorzugt am D₄ Rezeptor. Systematische Beeinflussung der Bindungseigenschaften durch die verschiedenen Phenylsubstituenten lassen sich nicht erkennen. Die untersuchten Phenylsubstituenten scheinen keinen Einfluss auf das Bindungsprofil auszuüben.

D.4.3.2 Arylpiperazinderivate mit verkürztem Spacer

Wird der Heterocyclus 6-Chloro-1,3-benzothiazol über eine kurze Amidbrücke mit einem Arylpiperazinteil zu einem relativ starren Molekül verbunden, so geht die Affinität zum 5-HT_{2A} Rezeptor und den Dopaminrezeptoren fast vollständig verloren. Erstaunlicherweise zeigt die *o*-Methoxyverbindung AD12 eine gute Affinität zum D₄ Rezeptor (K_i = 94nM). Auch die *p*-Nitroverbindung hat eine messbare D₄ Affinität, die sich jedoch nur im oberen mikromolaren Bereich bewegt (siehe Tabelle D-25).

Aufgrund dieser interessanten D₄ Selektivität wurden weitere 2-Methoxyderivate mit 1,3-Benzothiazol Heterozyclus untersucht. Die Ergebnisse sind Tabelle D-26 zu entnehmen. Auch die Nitrobenzothiazol- und die Methylbenzothiazolverbindungen AD30 und AD34 zeigen, wie die Chlorbenzothiazolverbindung AD12, eine D₄ Selektivität. Wie auch in früheren Arbeiten von Abadi und Lober [Lober et al., 1999; Abadi, 2004] an Arylpiperazinen, die über eine Methylenbrücke mit einem Heteroaromaten verbunden sind, festgestellt wurde, begünstigt ein Flexibilitätsverlust die Affinität zum D₄ Rezeptor.

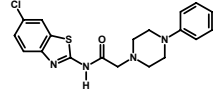
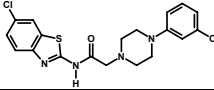
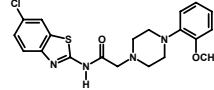
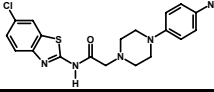
Substanzcode (weitere Chiffren)	Struktur	Affinitäten aus Radioligandbindungsexperimenten					
		K _i -Wert [nM] MW ± SEM bzw. Senkung der gebunden Radioaktivität durch eine 10µM Lösung der Testsubstanz					
		5-HT _{2A}	D ₁	D ₅	D ₂	D ₃	D ₄
AD6 (226)		<60%	<60%	<60%	<60%	<60%	<60%
AD10b (227)		<60%	<60%	<60%	<60%	<60%	<60%
AD12 (228)		<60%	<60%	<60%	<60%	<60%	94,0 ± 15,0
AD15 (229)		<60%	<60%	<60%	<60%	<60%	8778 ± 1224

Tabelle D-25 Bindungsdaten der semi-rigiden Arylpiperazine mit verkürztem Spacer (Auszug aus Tabelle D-5)

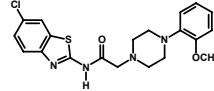
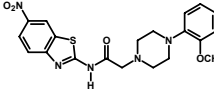
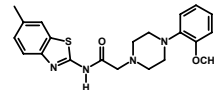
Substanzcode (weitere Chiffren)	Struktur	Affinitäten aus Radioligandbindungsexperimenten					
		K _i -Wert [nM] MW ± SEM bzw. Senkung der gebunden Radioaktivität durch eine 10µM Lösung der Testsubstanz					
		5-HT _{2A}	D ₁	D ₅	D ₂	D ₃	D ₄
AD12 (228)		<60%	<60%	<60%	<60%	<60%	94,0 ± 15,0
AD30 (235)		<60%	<60%	<60%	<60%	<60%	159 ± 54,5
AD34 (236)		<60%	<60%	<60%	<60%	<60%	3796

Tabelle D-26 Bindungsdaten der 2-Methoxyphenylpiperazine mit verkürztem Spacer (Auszug aus Tabelle D-5)

D.4.3.3 Arylpiperazinderivate ohne Amidfunktion – Ersatz der Amidbrücke durch einen Thiopropylspacer

Die untersuchten Verbindungen weisen insgesamt gute Affinitäten zu den Dopaminrezeptoren auf, die größtenteils im submikromolaren Bereich liegen. Einige zeigen eine schwache D₃ Selektivität (siehe Tabelle D-27 und Tabelle D-28). Eine D₄ Selektivität, wie bei den zuvor besprochenen Arylpiperazinderivaten (siehe Abschnitte D.4.3.1 und D.4.3.2), ist hier nicht zu beobachten. Zum 5-HT_{2A} Rezeptor besitzen die Benzothiazolderivate AD24 und AD27 keine Affinität, während die Benzoxazolderivate AD25 und AD29 und das Benzimidazolderivat AD31 gute Affinitäten aufweisen. Allerdings zeigen die Verbindungen mit Benzothiazolheterocyclus gegenüber den Derivaten mit anderen Heterocyclen eine schwache D₃ Selektivität. Vergleicht man die Benzothiazolderivate AD24 und AD27, sowie die Benzoxazolderivate AD25 und AD29, die sich jeweils nur durch den *p*-Chlorsubstituenten am Phenylring unterscheiden, so lassen sich keine bemerkenswerten Unterschiede im Bindungsprofil der

chloresubstituierten gegenüber der unsubstituierten Phenylverbindung feststellen. Wie auch bei den oben besprochenen Arylpiperazinen mit cyclischer Amidfunktion (siehe Abschnitt D.4.3.1) hat der Phenylsubstituent keinen erwähnenswerten Einfluss auf die Bindungseigenschaften.

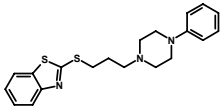
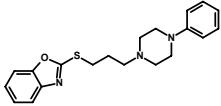
Substanzcode (weitere Chiffren)	Struktur	Affinitäten aus Radioligandbindungsexperimenten						Ergebnisse des Calcium Assays			
		K _i -Wert [nM] MW ± SEM bzw. Senkung der gebunden Radioaktivität durch eine 10µM Lösung der Testsubstanz						Antagonist (AN): K _i -Wert [nM] Agonist (AG): EC ₅₀ -Wert [nM] MW ± SEM			
		5-HT _{2A}	D ₁	D ₅	D ₂	D ₃	D ₄	D ₁	D ₅	D ₂	D ₃
AD24 (230)		<60% ± 198	569 ± 198	<60% ± 34,0	203 ± 4,50	14,1 ± 4,94	202 ± 51,5	AN 347	n.b.	n.a.	n.b.
AD25 (231)		151 ± 61,7	718 ± 69,0	358 ± 34,0	243 ± 9,00	79,5 ± 2,05	152 ± 8,00	AN 279	n.b.	AN 19,9	n.b.

Tabelle D-27 Bindungsdaten der Phenylpiperazinderivate mit Thiopropylspacer anstelle einer Amidbrücke (Auszug aus Tabelle D-5)

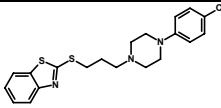
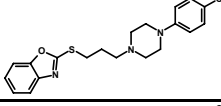
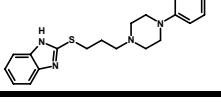
Substanzcode (weitere Chiffren)	Struktur	Affinitäten aus Radioligandbindungsexperimenten						Ergebnisse des Calcium Assays			
		K _i -Wert [nM] MW ± SEM bzw. Senkung der gebunden Radioaktivität durch eine 10µM Lösung der Testsubstanz						Antagonist (AN): K _i -Wert [nM] Agonist (AG): EC ₅₀ -Wert [nM] MW ± SEM			
		5-HT _{2A}	D ₁	D ₅	D ₂	D ₃	D ₄	D ₁	D ₅	D ₂	D ₃
AD27 (232)		<60% ± 33,8	200 ± 33,8	460 ± 58,5	537 ± 23,5	68,7 ± 5,80	912 ± 35,5	n.a.	n.b.	n.a.	n.b.
AD29 (233)		168 ± 62,3	146 ± 30,0	224 ± 20,0	411 ± 70,0	126 ± 7,00	226 ± 47,5	AN 687	n.b.	n.a.	n.b.
AD31 (234)		99,3 ± 18,7	1438 ± 115	961 ± 242	952 ± 117	123 ± 0,50	245 ± 61,6	AN 89	n.b.	AN 420	n.b.

Tabelle D-28 Bindungsdaten der p-Chlorphenylpiperazinderivate mit Thiopropylspacer anstelle einer Amidbrücke (Auszug aus Tabelle D-5)

D.4.4 Apomorphinderivate

D.4.4.1 Thiazolo- und Isothiazoloderivate

Die untersuchten Thiazolo- und Isothiazoloapomorphine repräsentieren eine neue Gruppe von 2,3-disubstituierten Apomorphinen. Mit Ausnahme von AM8 und AM7 zeigen die Verbindungen zu allen untersuchten Dopaminrezeptoren Affinitäten im mikromolaren und submikromolaren Bereich. Bei der Phenylisothiazolverbindung AM7 ist nur am D₂ Rezeptor eine schwache Affinität zu beobachten.

Interessanterweise binden alle Verbindungen (auch AM8) an den 5-HT_{2A} Rezeptor, wobei die Methyloisothiazolverbindung AM6 mit einem K_i-Wert von 52,4nM die beste Affinität zeigt (siehe Tabelle D-29).

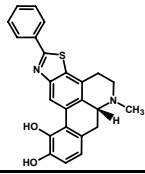
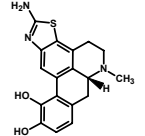
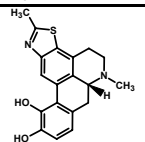
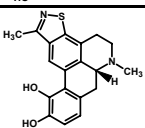
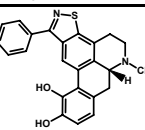
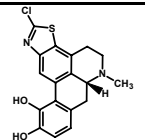
Substanzcode (weitere Chiffren)	Struktur	Affinitäten aus Radioligandbindungsexperimenten						Ergebnisse des Calcium Assays			
		K _i -Wert [nM] MW ± SEM bzw. Senkung der gebunden Radioaktivität durch eine 10µM Lösung der Testsubstanz						Antagonist (AN): K _i -Wert [nM] Agonist (AG): EC ₅₀ -Wert [nM] MW ± SEM			
		5-HT _{2A}	D ₁	D ₅	D ₂	D ₃	D ₄	D ₁	D ₅	D ₂	D ₃
AM2 (247)		1725 ± 372	1812 ± 48,5	219 ± 40,5	3212 ± 886	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
AM3 (248)		1407 ± 396	2113 ± 203	231 ± 3,50	904 ± 187	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
AM4 (249)		2825 ± 225	2753 ± 61,0	592 ± 123	3561 ± 631	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
AM6 (251)		52,4 ± 10,0	1027 ± 137	309 ± 71,0	89,6 ± 16,3	<60%	1142 ± 603	AG 78,2 ± 15,4	n.b.	AG 124	n.b.
AM7 (252)		1731 ± 22,0	<60%	<60%	6810 ± 955	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
AM8 (253)		2471 ± 289	<60%	<60%	<60%	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.

Tabelle D-29 Bindungsdaten der Thiazolo- und Isothiazoloapomorphine (Auszug aus Tabelle D-6)

Liu et al. untersuchten 2008 die Aminothiazolverbindung AM3 am D₁ und D₂ Rezeptor und fanden Affinitäten im mikromolaren (D₁) und submikromolaren (D₂) Bereich (K_i-Werte: D₁ = 2520±313nM, D₂ = 328±110nM) [Liu et al., 2008]. Die Verbindung erwies sich damit

gegenüber der Leitsubstanz Apomorphin als weniger potent, zeigte aber eine bessere D_1/D_2 Selektivität (AM3 $D_1/D_2 = 7,6$; Apomorphin 3,4). Die Ergebnisse der Radioligandbindungsexperimente, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, konnten diese Selektivität der Amino-thiazol-Verbindung nicht bestätigen. Interessanterweise zeigt die Verbindung AM3 aber eine 9,1-fache D_1/D_5 Selektivität. Auch bei den anderen Verbindungen mit Dopaminrezeptoraffinität ist eine D_1/D_5 Selektivität zu beobachten.

Die beste D_1/D_2 Selektivität hat die Methylisothiazoloverbindung AM6 ($D_1/D_2 = 11,5$), welche gleichzeitig auch die affinste Verbindung darstellt. Innerhalb der D_2 Rezeptorfamilie ist eine D_2 Selektivität zu beobachten (siehe Tabelle D-29). Im funktionellen Calcium Assay zeigte AM6 agonistische Aktivität.

Im Fall der Isothiazolderivate AM6 und AM7 scheint der räumliche Anspruch des Substituenten am Isothiazolheterocyclus, der sich in Nachbarschaft zur 2-Position des Apomorphingrundgerüsts befindet, von Bedeutung für die Rezeptoraffinitäten zu sein. Das widerspricht der allgemein anerkannten Feststellung, dass die Rezeptoraffinitäten nicht von der Größe des Substituenten in 2-Stellung des Apomorphingrundgerüsts abhängen und auch raumerfüllende Substituenten ohne Affinitätsverlust toleriert werden (sowohl 2-Methoxy-, als auch 2-(4-Hydroxyphenyl)apomorphine haben hohe Affinitäten zu Dopaminrezeptoren) [Sondergaard et al., 2005; Zhang et al., 2007b]. Eine mögliche Ursache dieser Erscheinung könnten die durch Einführung der Isothioazolstruktur in das Apomorphingrundgerüst veränderten elektrostatischen Verhältnisse im Molekül sein.

D.4.4.2 4H-Thiochromanderivate

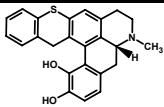
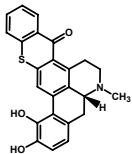
Substanzcode (weitere Chiffren)	Struktur	Affinitäten aus Radioligandbindungsexperimenten					
		K _i -Wert [nM] MW ± SEM bzw. Senkung der gebunden Radioaktivität durch eine 10µM Lösung der Testsubstanz					
		5-HT _{2A}	D ₁	D ₅	D ₂	D ₃	D ₄
AM1 (246)		4811 ± 325	3237 ± 171	<60%	2096 ± 886	n.b.	n.b.
AM5 (250)		779 ± 274	252 ± 29,5	70,6 ± 5,44	1167 ± 277	1152 ± 630	7443 ± 1184

Tabelle D-30 Bindungsdaten der Thiochromanderivate (Auszug aus Tabelle D-6)

Verglichen mit Apomorphin als bekanntem D_2 Agonisten (K_i -Werte: $D_1 = 157$ nM siehe Tabelle D-7, $D_2 = 32$ nM Wert aus Literatur [Hsieh et al., 2004]) haben die untersuchten Thiochromanderivate am D_2 Rezeptor nur schwache Affinitäten. Die höchste Affinität der beiden getesteten Verbindungen zeigt das 2,3-Thiochromanderivat AM5 am D_1 Rezeptor. Allerdings ist hier keine D_2 Spezifität wie beim Apomorphin zu beobachten. Aufgrund dieses

unerwarteten Ergebnisses wurde AM5 auch an den restlichen Dopaminrezeptorsubtypen getestet. Die Verbindung zeigt submikromolare Affinitäten zu Rezeptoren der D₁ Familie und zum 5-HT_{2A} Rezeptor, während die Affinitäten zu den Rezeptoren der D₂ Familie im mikromolaren Bereich liegen.

D.4.4.3 2-Hydroxyapomorphine mit Benzylsubstituenten in 1-Stellung

Gao et al. beobachteten bei 2-Hydroxyapomorphin ohne Substituenten in 2-Stellung eine herausragende das unsubstituierte Apomorphin übertreffende, D₁/D₂ Selektivität mit einer subnanomolare Affinität zum D₂ Rezeptor ($K_i = 0,38\text{nM}$) und einem K_i -Wert von 800nM am D₂ Rezeptor [Gao et al., 1990]. Nach Einführung einer Methylgruppe in 2-Stellung (Verbindung AM3a), ist nur noch eine leichte D₁/D₂ Selektivität zu beobachten, während bei allen anderen untersuchten Verbindungen mit 2-Substitution die Selektivität völlig verloren ging. Einführung eines *p*-Nitrobenzylsubstituenten mit elektronenarmem Aromaten führte sogar zu völligem Affinitätsverlust an allen untersuchten Rezeptoren. Die Affinitäten der 2-substituierten Hydroxyapomorphine liegen sowohl an den untersuchten Dopaminrezeptor Subtypen, als auch am 5-HT_{2A} Rezeptor – wie die Affinitäten des unsubstituierten Apomorphins – im submikromolaren Bereich. Die Untersuchung der funktionellen Eigenschaften der Verbindungen AM1a bis AM4a im funktionellen Calcium Assay ergab agonistische Aktivitäten.

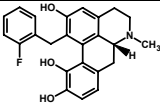
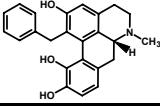
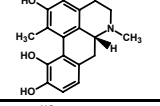
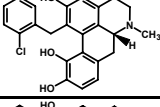
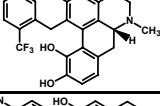
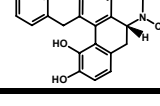
Substanzcode (weitere Chiffren)	Struktur	Affinitäten aus Radioligandbindungsexperimenten						Ergebnisse des Calcium Assays			
		K _i -Wert [nM] MW ± SEM bzw. Senkung der gebunden Radioaktivität durch eine 10µM Lösung der Testsubstanz						Antagonist (AN): K _i -Wert [nM] Agonist (AG): EC ₅₀ -Wert [nM] MW ± SEM			
		5-HT _{2A}	D ₁	D ₅	D ₂	D ₃	D ₄	D ₁	D ₅	D ₂	D ₃
AM1a (254)		262 ± 25,0	102 ± 32,0	53,4 ± 19,1	56,4 ± 9,20	n.b.	n.b.	AG 19,8	n.b.	AG 1,05	AG 11,0
AM2a (255)		336 ± 35,0	83,4 ± 33,6	49,5 ± 9,00	166 ± 4,00	n.b.	n.b.	AG 8,81	n.b.	AG 1,60	n.b.
AM3a (256)		246 ± 12,5	1434 ± 164	569 ± 35,0	387 ± 50,4	n.b.	n.b.	AG 346	n.b.	AG 26,9	n.b.
AM4a (257)		233 ± 0,50	243 ± 35,5	117 ± 37,8	106 ± 26,4	n.b.	n.b.	AG 441	n.b.	n.b.	n.b.
AM5a (258)		253 ± 42,5	236 ± 72,5	208 ± 48,0	312 ± 75,5	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
AM6a (259)		<60%	<60%	<60%	<60%	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.

Tabelle D-31 Bindungsdaten der 2-Hydroxyapomorphine (Auszug aus Tabelle D-6)

E ZUSAMMENFASSUNG

Mit dem Ziel, Strukturen zu identifizieren, die aufgrund eines neuartigen Affinitätsprofils oder einer hohen Subtypselektivität als potentielle antipsychotische Wirkstoffe oder pharmakologische Werkzeuge zur Erforschung dopaminerger und serotonerger Neurotransmission interessant sein könnten, wurden Substanzen verschiedener Verbindungsklassen auf ihre Affinität zu humanen 5-HT_{2A} Rezeptoren und den verschiedenen humanen Dopaminrezeptorsubtypen untersucht. Teilweise wurde auch die Rezeptorfunktionalität in einem fluoreszenzbasierten Calcium Assay bestimmt.

Der Zielstellung der vorliegenden Arbeit (siehe Abschnitt A.3) folgend sollen nun die erhaltenen Ergebnisse zusammengefasst werden.

E.1 Assay Entwicklung

Die geplante Etablierung und Charakterisierung von HEK D₂ und D₃ Zelllinien für Radioligandbindungsexperimente zum Ersatz der entsprechenden CHO Zelllinien wurde erfolgreich durchgeführt. Weiterhin gelang es, nach Etablierung und Charakterisierung einer HEK 5-HT_{2A} Zelllinie, ein dem Arbeitskreis bisher nicht zur Verfügung stehendes Radioligandbindungsassay an 5-HT_{2A} Rezeptoren aufzubauen.

Zudem wurden die bestehenden Möglichkeiten an funktionellen Assays erweitert, indem der im Arbeitskreis bereits für D₁, D₂ und D₅ Rezeptoren angewendete Calcium Assay erfolgreich auf HEK D₃ und HEK 5-HT_{2A} Zelllinien übertragen wurde. Sowohl bei HEK D₃ als auch bei HEK 5-HT_{2A} Zellen gelang es, durch die Einwirkung eines entsprechenden Agonisten ein reproduzierbares dosisabhängiges Calciumsignal hervorzurufen, welches sich durch Antagonisten ebenfalls dosisabhängig hemmen ließ.

E.2 Untersuchung von Azecinen und Homoazecinen und Synthese von Oxazacycloundecanen

Zur Synthese des Benzindoloderivats FM7 mit sauerstoffhaltigem zentralen 11-Ring wurde ein 7-Ring Lacton mit Tryptamin zum Hydroxybenzamid umgesetzt und dieses über einen doppelten Ringschluss nach Bischler-Napieralski und reduktive Zyklisierung in ein pentacyclisches Zwischenprodukt überführt, welches nach Quarternisierung und Ringspaltung unter Birch-Bedingungen die Zielverbindung lieferte (siehe Abbildung E-1).

Die Synthesen der hydroxylierten und methoxylierten Dibenzderivate FM12 und FM25 sollte auf dem gleichen Weg ausgehend von 3-Methoxyphenylethylamin bzw. geschütztem Hydroxyphenylethylamin anstelle von Tryptamin erfolgen. Diese konnten jedoch nicht realisiert werden, da sich die tetracyclische Vorstufe der Methoxyverbindung nicht am cycloaliphatischen Stickstoff methylieren ließ und die entsprechende tetracyclische Vorstufe des geschützten Hydroxyderivats nicht aus dem entstandenen Produktgemisch isoliert

werden konnte. Auch der Versuch, die aliphatische Hydroxygruppe der Hydroxybenzamidvorstufe des Hydroxydibenzderivats FM25 während des ersten Ringschlusses zu schützen, führte nach dem zweiten Ringschluss zu einem nicht aufzureinigenden Produktgemisch.

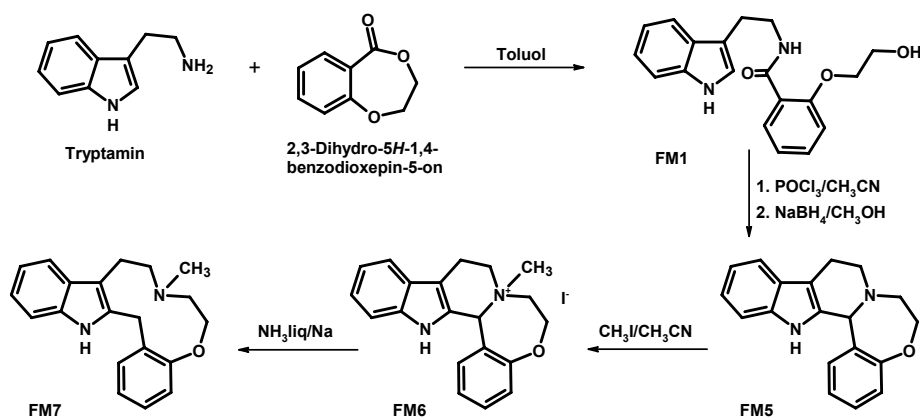


Abbildung E-1 Synthese von 8-Methyl-7,8,9,10,15,16-hexahydro-6H-indolo[3,2-g][1,4]benzoxazacycloundecan (FM7)

Ein alternativer Versuch zur Darstellung des Methoxyderivats führte über eine *N*-Acylierung der tetracyclischen Zwischenstufe und anschließende Spaltung der zentralen C-*N*-Bindung zum Urethan, welches zur *N*-Methylverbindung reduziert wurde. Es gelang jedoch nicht, das Produkt in zufriedenstellender Reinheit zu gewinnen, so dass auf die Angabe analytischer Daten und pharmakologischer Ergebnisse verzichtet werden muss.

Die Untersuchung der 5-HT_{2A}- und Dopaminrezeptor-Bindungseigenschaften von insgesamt 50 Azecinen und Homoazecinen führte zu folgenden Ergebnissen:

- Die Hälfte der untersuchten Benzindoloderivaten, aber nur 5 von 39 untersuchten Dibenzderivaten, zeigen subnanomolare Affinitäten zum 5-HT_{2A} Rezeptor.
- Die Indolderivate sind generell höheraffin als die Dibenzderivate. Die Anteile hochaffiner Verbindungen unter den Indolderivaten nehmen in der Reihenfolge 5-HT_{2A}>D₁>D₂ ab. Das gilt auch für die Dibenzverbindungen.
- Nur bei 16 der 50 untersuchten Verbindungen – darunter 4 von 11 Indol- und 12 von 39 Dibenzderivaten – ist die Affinität zu D₁ deutlich höher als die zum D₂ Rezeptor.
- Die beiden 11-Ringderivate CE541 (ein dichloro-hydroxy-substituiertes Dibenzderivat) und FM7 (oxahomologe Benzindoloverbindung) haben dagegen, bezogen auf den D₁ Rezeptor, eine deutlich höhere Affinität zum D₂ Rezeptor.
- Das Bisindoloderivat MI506 ausgenommen, zeigen alle D₂/D₁ selektiven Verbindungen auch eine klare D₂/5-HT_{2A} Selektivität.
- Innerhalb der D₁ Familie sind nur drei der vermessenen Verbindungen selektiv. Das 2-Amino-3-hydroxydibenzazecin PM98 bindet im Vergleich zum D₅ Rezeptor mit 24-fach stärkerer Affinität am D₁ Rezeptor, während die 11-Methoxybenzindoloverbindung SM

mit methyliertem Indolstickstoff und das 3-Methoxyoxazacycloundecan WW60 eine 10- bzw. 20-fach schwächere Affinität zum D₁ Rezeptor zeigen.

- Zwischen D₁ und 5-HT_{2A} Affinitäten besteht bei 41 Verbindungen kein nennenswerter Unterschied, während 9 Verbindungen eine deutlich höhere Affinität zum 5-HT_{2A} Rezeptor zeigen, darunter 6 von 10 Benzindoloderivaten.
- Sechszwanzig der insgesamt 50 untersuchten Verbindungen, darunter alle Benzindoloderivate, haben eine deutlich stärkere 5-HT_{2A} Affinität im Vergleich zu D₂ und besitzen damit laut Meltzers „Serotonin-Dopamin“-Hypothese ein Merkmal atypischer Neuroleptika.
- Die 5-HT_{2A} Affinitäten der Azecin- und Homoazecinderivate korrelieren stärker mit den Affinitäten zur D₁ Familie als mit den Affinitäten zu den Rezeptoren der D₂ Familie.
- Werden nur die Indolderivate betrachtet, so ist zwischen 5-HT_{2A} und Dopaminrezeptor-Affinitäten keine nennenswerte Korrelation zu beobachten, während die Dibenzderivate eine klare Korrelation zwischen 5-HT_{2A} und D₁ Affinitäten aufweisen.
- Eine Überlegenheit von Hydroxyverbindungen gegenüber den analogen Methoxyderivaten bezüglich ihrer 5-HT_{2A} Affinität ist nur bei in 3-Position substituierten *N*-Methyldibenzderivaten zu beobachten, die über genau eine (und nicht zwei) Hydroxyphenylethyl-Teilstruktur verfügen.
- Im Gegensatz zu den Dopaminrezeptoraffinitäten unterscheiden sich die 5-HT_{2A} Affinitäten des Benzindoloxazacycloundecans FM7 und dessen sauerstofffreiem Analogon CE560 drastisch. Die Einführung des elektronegativen Sauerstoffs in das lipophile Molekül geht mit einem Affinitätsverlust einher.
- Die gegenüber den rigiden penta- und tetracyclischen Synthesestufen erhöhte Flexibilität der Azecin- und Homoazecinderivate ist essentiell für eine Affinität zu 5-HT_{2A} und Dopaminrezeptoren.

E.3 Untersuchung von Arylpiperazinderivaten

Nach Untersuchung der 5-HT_{2A} und Dopaminrezeptorsubtyp-Affinitäten verschiedener Arylpiperazinderivate mit heterocyclischer Seitenkette, welche anhand D₃ selektiver Leitsubstanzen entwickelt wurden, lassen sich folgende Aussagen treffen:

- Eine Affinität zu allen der untersuchten Rezeptoren besitzen nur Moleküle, deren Arylpiperazinteil über einen flexiblen Spacer mit der entsprechenden heterocyclischen Struktur verbunden ist.
- Verknüpfung eines Heterocyclus mit Lactamstruktur über einen Butylspacer mit dem Arylpiperazinteil führt gegenüber den Leitstrukturen mit exocyclischer Amidbrücke zu einem Verlust der D₃ Selektivität.

- Moleküle, in denen eine Indolinonstruktur mit dem Butylarylpipezazin verknüpft ist, sind D₄ selektiv.
- Semi-rigide Moleküle mit kurzer exocyclischer Amidbrücke zeigen, mit Ausnahme einer geringen D₄ Bindung, keine Affinität zu den untersuchten Rezeptoren.
- Arylpipezazinderivate mit flexiblem Thiopropylspacer und Benzothiazolheterocyclus zeigen D₃ Selektivität.
- Die Substituenten am Phenylrest des Arylpipezazinteils beeinflussen die Bindungseigenschaften nicht.
- Bei den Verbindungen, die im funktionellen Calcium Assay untersucht wurden, handelt es sich um Antagonisten an den entsprechenden Rezeptoren.

E.4 Bindungsstudien mit Apomorphinderivaten

Die Bindungseigenschaften der am A-Ring des D₂ Agonisten Apomorphin modifizierten Derivate verhalten sich wie folgt:

- Verbindungen mit anelliertem Thiazol haben nur schwache Affinitäten zum 5-HT_{2A} Rezeptor und schwache bis gar keine Affinitäten zu den untersuchten Dopaminrezeptoren. Die D₁/D₂ Selektivität der Leitstruktur geht verloren, stattdessen ist ein schwacher D₁/D₅ Affinitätsunterschied zu beobachten.
- Die Affinität der Isothiazolderivate wird von den Substituenten in 3-Position beeinflusst. Große raumerfüllende Strukturen wie Phenyl werden hier nicht toleriert, obwohl große Substituenten in benachbarter 2-Stellung des Apomorphingrundgerüsts keinen negativen Einfluss auf die Bindungseigenschaften haben.
- Das 2,3-Thiochromanonderivat AM5 bindet im Gegensatz zur Leitstruktur Apomorphin bevorzugt an Rezeptoren der D₁ Familie, während das 1,2-Thiochromanderivat AM1 keine erwähnenswerten Affinitäten zeigt.
- In 1-Stellung substituierte 2-Hydroxyapomorphine besitzen bis auf die *p*-Nitroverbindung, welche nicht affin ist, zu allen untersuchten Rezeptoren (5-HT_{2A}, D₁, D₂, D₅) größtenteils submikromolare Affinitäten, allerdings ging die D₂ Selektivität des in 1-Stellung unsubstituierten 2-Hydroxyapomorphins verloren.
- Verbindungen die im funktionellen Calcium Assay untersucht wurden, zeigten agonistische oder partialagonistische Aktivität.

F SUMMARY

The affinities of several substances, belonging to different structural classes, were examined at the human 5-HT_{2A} receptors as well as the different dopamine receptor subtypes, in order to identify the structures, whose affinity profile or high subtype selectivity, render them suitable as potential antipsychotics or pharmacological tools for studying dopaminergic and serotonergic neurotransmissions. Their functionality was also partly investigated in a fluorescent calcium assay.

Objectives of the current work are described in section A.3. The obtained results are summarized subsequently.

F.1 Assay development

The planned establishment and characterization of HEK D₂ and D₃ cell lines, to replace the corresponding CHO cell lines, was successfully executed. Moreover, the establishment and characterization of HEK 5-HT_{2A} cell line, helped to provide the research group with a previously unavailable radioligand assay at these receptors.

Additionally, the scope of the existing functional assay was extended to also cover the HEK D₃ and the HEK 5-HT_{2A} cell lines, by implementing the same principles, already applied at the D₁, D₂ and D₅ receptors.

F.2 Studies on azecines and homoazecines and the synthesis of oxacyclo-undecenes

In order to synthesize the benzindolo derivative FM7, enclosing an oxygen-containing central 11-membered ring, a 7-membered lactone was reacted with tryptamine. The obtained hydroxybenzamide derivative was cyclized under Bischler-Napieralski conditions and subsequently reduced to afford the pentacyclic intermediary product. The target compound was obtained after quaternization followed by reduction using Birch conditions.

Trials to similarly synthesize the hydroxy- und methoxydibenzo derivatives FM12 und FM25 starting from 3-methoxyphenethylamine or rather protected hydroxyphenylethylamine instead of tryptamine were unsuccessful. The tetracyclic intermediate of the methoxy-derivative could not be quaternized at the alicyclic nitrogen, and the corresponding tetracyclic intermediate of the protected hydroxy-derivative could not be isolated from the obtained reaction mixture.

The trial to first protect the hydroxyl group of the hydroxybenzamide precursor prior the first cyclization step were also in vain; the second cyclization step led to a mixture of products, which could not be purified.

Alternatively, the methoxy-derivative was prepared via *N*-acylation of the tetracyclic intermediate followed by bond cleavage of the central C-*N*-bond to afford the corresponding carbamate derivative. This was reduced to the *N*-methyl derivative. However, the product

could not be obtained in a sufficiently pure form. Hence, both analytical and pharmacological results are not described.

Investigation of the binding properties of 50 azecines and homoazecines at the 5-HT_{2A} and dopamine receptors led to the following results:

- Half of the tested benzindole, but only 5 out of 39 dibenzazecine derivatives, showed subnanomolar affinities at 5-HT_{2A} receptor
- Indol-derivatives generally possessed higher affinities for the investigated receptors than the dibenzazecines. In the fraction of highly affine benzindoles, the affinities decreased in the following order: 5-HT_{2A}>D₁>D₂. The same applies for the dibenzazecines.
- The D₁ affinity of 16 out of 50 investigated compounds was much higher than their D₂ affinity. This includes 4 out of 11 investigated indolo-derivatives and 12 out of 39 dibenzo-derivatives.
- Conversely, both derivatives containing a central 11-membered ring, namely CE541 (a dichloro-hydroxy-substituted dibenz-derivative) and FM7 (oxygen-containing benzindole), had a significantly higher affinity for D₂ relative to D₁.
- Apart from the benzindolo-derivative MI506, all other D₂/D₁ selective compounds also displayed a clear D₂/5-HT_{2A} selectivity.
- Only three of the tested compound showed selectivity among the receptors of the D₁ family and an significant difference between these determined affinities. 2-Amino-3-hydroxydibenzazecine PM98 binds by a 24fold more strongly at the D₁ receptor, whereas the 11-methoxybenzindolo derivative SM and the 3-methoxy-oxazacycloundecene WW60 had a 10-20fold weaker affinity for the D₁ receptor compared with their D₅ affinities.
- 41 compounds did not show any noteworthy difference in the affinities for D₁ and 5-HT_{2A}, while 9 compounds, including 6 out of 10 benzindoles, displayed a clearly higher affinity for 5-HT_{2A}.
- 26 out of the 50 investigated substances, among which were all benzindolo derivatives, displayed an evident superiority in the affinities for 5-HT_{2A} to that for D₂. According to Meltzers dopamine/serotonin hypothesis, this is characteristic for atypical neuroleptics.
- The 5-HT_{2A} affinities of azecines and homoazecines correlated more with the affinities for the D₁ family than with those for D₂ family.
- The indolo-derivatives showed no noteworthy correlation between the affinities for 5-HT_{2A} and dopamine receptors, while the dibenzo-derivatives displayed a clear correlation between the affinities for 5-HT_{2A} and D₁ family.
- The hydroxyl-derivatives were superior over analogous methoxy-derivatives in their affinities for 5-HT_{2A}. This could only be observed with 3-substitued *N*-methyldibenzo-derivatives, encompassing one (and not two) hydroxyphenethyl moiety.

- The affinities of the benzindoloxazacycloundecene FM7 and its analogous CE560 differed greatly for 5-HT_{2A}, contrary to those for dopamine receptors. Introduction of the electronegative oxygen atom into the lipophilic molecule resulted in reduced affinities.
- The higher flexibility of the azecines and homoazecines, compared with their rigid tetra- and pentacyclic precursors, is essential for the affinities for 5-HT_{2A} and dopamine receptors.

F.3 Studies on arylpiperazine derivatives

Investigating the dopamine and 5-HT_{2A} affinities of different arylpiperazines, developed on the basis of D₃-selective lead structures, lead to the following conclusions:

- Only molecules, where the arylpiperazine is attached through a flexible spacer to the corresponding heterocyclic moiety, had an affinity for all investigated receptors.
- Linking the arylpiperazine and another heterocyclic group, containing a lactam structure by a butyl spacer led to loss of D₃ selectivity, when compared with the lead structures, which contain an exocyclic amide bridge.
- Compounds where an indolino group is linked with a butylaryl piperazine are selective for D₄ receptors.
- Semi-rigid molecules with a shorter exocyclic amide bridge showed, with the exception of a marginal D₄ affinity, no affinities for all other investigated receptors.
- Arylpiperazines, holding a flexible thiopropyl spacer and benzothiazolheterocyclic ring, exhibited D₃ selectivity.
- Phenyl substitution at the arylpiperazine moiety did not affect the binding properties of the studied compounds.
- All compounds, tested in the calcium assay, had antagonistic properties at the corresponding receptors.

F.4 Binding studies on apomorphine derivatives

Modified derivatives, substituted at the A-ring of the D₂ agonist apomorphine, showed the following:

- Compounds with an annelated thiazole ring had only weak affinities for the 5-HT_{2A} receptor and weak to no affinities for the dopamine receptors. The D₁/D₂ selectivity of the lead was lost, however a weak D₁/D₅ selectivity could be observed.
- The affinity of the isothiazole -derivatives is affected by the substituent at the 3-position. Bulky space-filling substituents, such as phenyl group, were not well tolerated, although similarly bulky substituents at the neighbouring 2-position did not have a negative effect on the binding properties.

- Contrary to the lead apomorphine, the 2,3-thiochromanone derivative AM5 showed a preference for D₁-family receptors. The 2-thiochromane derivative AM1 displayed no notable affinities.
- 2-Hydroxyapomorphines, substituted at position-1, mostly displayed submicromolar affinities for all investigated receptors (5-HT_{2A}, D₁, D₂, D₅). The only exception was the *p*-nitro derivative, which had no affinities. However, the D₂ selectivity of the compounds was abolished, when compared with 2-hydroxyapomorphines, bearing no substituents at the 1-position.

G EXPERIMENTELLER TEIL – SYNTHESSEN

G.1 Allgemeine Angaben zu Materialien und Geräten

Dünnschichtchromatographie

DC-Alufolien, Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, Darmstadt)

Elementaranalyse

Vario EL III (CHNOS Elementaranalysator) (Elementar Analysensysteme GmbH, Hanau)

Die Messungen wurden am Institut für Organische Chemie der FSU Jena durchgeführt.

Säulenchromatographie

Kieselgel 60 (Merck, Darmstadt)

Schmelzpunktbestimmung

Melting Point Apparatus (Weiss-Gallenkamp, Loughborough, United Kingdom)

nicht korrigiert

Infrarotspektren

Thermo Nicolet Avatar 370 DTGS FTIR-Spektrometer (Therma Electron Corporation, Waltham, MA, USA)

Kernresonanzspektroskopie (¹H- und ¹³C-NMR-Spektren)

Avance 200, Avance 250, Avance 400 (Bruker Biopsin, Karlsruhe)

Die Messungen wurden am Institut für Organische Chemie der FSU Jena durchgeführt.

Massenspektren (hochauflösende Masse)

TSQ Quantum AM Spectrometer (Therma Electron Corporation, Waltham, MA, USA)

Die Messungen wurden am Hans-Knöll-Institut in Jena durchgeführt.

Molekularmassenbestimmung

Atomgewichtstabelle von 1962, bezogen auf ¹²C

G.2 Monographien

G.2.1 2-(2-Hydroxyethoxy)-N-[2-(1H-indol-3-yl)ethyl]benzamid (FM1)

4g (24mmol) 2,3-Dihydro-5H-1,4-benzodioxepin-5-on und 4g (25mmol) Tryptamin werden in 50ml Toluol gelöst und 19 Stunden lichtgeschützt, unter Rückfluss und Stickstoffbegasung erhitzt. Nach dem Abkühlen wird abdekantiert und der wachsartige, rotbraune, mit weißen Kristallen durchsetzte Rückstand in viel heißem Toluol gelöst. Beim Abkühlen entstehen durchscheinende, farblose Plättchen. Die Kristalle werden abfiltriert, mit Ether gewaschen und der weiße Feststoff im Vakuum getrocknet.

MG: C₁₉H₂₀N₂O₃ (324,4g/mol)

Ausbeute: 5,1g (66%), weißer Feststoff

R_f: 0,45 (CH₂Cl₂/CH₃OH 9:1)

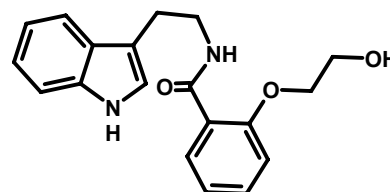
Schmelzpunkt: 130°C

Elementaranalyse:

gemessen: C(%) = 70,07; H(%) = 6,27; N(%) = 8,58

berechnet für C₁₉H₂₀N₂O₃: C(%) = 70,35; H(%) = 6,21; N(%) = 8,64

IR-Daten (KBr, cm⁻¹): 3649, 3362, 3211, 2931, 1624, 1534, 1457, 1234, 1107-1029, 756



¹H-NMR 250 MHz in DMSO-*d*₆

δ [ppm]	Multiplizität (J [Hz])	Integration	Zuordnung
2,93-2,99	t (7,5)	2H	Indol-CH ₂
3,56-3,64	dt (7,1)	2H	CH ₂ -NH-C=O
3,70-3,76	dt (4,9)	2H	CH ₂ -OH
4,12-4,15	t (4,7)	2H	Ph-O-CH ₂
5,11-5,15	t (5,1)	1H	CH ₂ -OH
6,94-7,21	m	5H	arom.
7,33-7,36	d (7,8)	1H	arom., H7
7,41-7,48	m	1H	arom.
7,57-7,60	d (7,8)	1H	arom., H4
7,86-7,89	dd (1,7; 5,9)	1H	arom., H6'
8,54-8,58	t (5,5)	1H	NH-C=O
10,81	s	1H	Indol NH

¹³C-NMR+DEPT in DMSO-*d*₆

δ [ppm]	Zuordnung	δ [ppm]	Zuordnung
25,56	Indol-CH ₂	121,39	2x arom.
40,47	CH ₂ -NH-C=O	123,07	arom.
59,79	CH ₂ -OH	123,27	arom., quart.
71,30	Ph-O-CH ₂	127,67	arom., quart.
111,82	arom.	131,28	arom.
112,27	arom., quart.	132,81	arom.
114,43	arom.	136,72	arom., quart.
118,67	arom.	157,12	arom., quart., C2'
118,77	arom.	164,97	arom., quart., C=O

G.2.2 6,7,9,10,15,15b-Hexahydroindolo[2',3':3,4]pyrido[1,2-d][1,4]benzoxazepin-hydrochlorid (FM5)

2,5g (7,7mmol) 2-(2-Hydroxyethoxy)-*N*-[2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl]benzamid (FM1), werden in 150ml Acetonitril gelöst, mit 20ml Phosphorylchlorid versetzt und unter Rühren für 4 Stunden zum Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wird das Phosphorylchlorid und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand dreimal mit heißem Petrolether gewaschen und in 200ml Methanol aufgenommen. Die methanolische Lösung wird unter Rühren und Eiskühlung langsam mit 2g Natriumborhydrid versetzt und nach Abklingen der Reaktion eine Stunde unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wird im Vakuum eingeeengt und der sirupöse Rückstand in 15ml Wasser aufgenommen. Dreimalige Extraktion der alkalischen Wasserphase mit je 20ml Dichlormethan, Trocknen der organischen Phase über Natriumsulfat, Filtration und Entfernen des Lösemittels im Vakuum führt zu einem gelben, öligen Rohprodukt. Nach Lösen in wenig Chloroform und Zusatz einiger Tropfen etherischer Salzsäure kristallisiert das Hydrochlorid als beiger Feststoff, der abfiltriert, mit Chloroform gewaschen und im Vakuum getrocknet wird. Alle Arbeitsschritte werden lichtgeschützt unter Stickstoffbegasung durchgeführt.

MG: C₁₉H₁₉ClN₂O (326,8g/mol)

Ausbeute: 0,94g (43%), beiger, feinkristalliner Feststoff

R_f: 0,31 (CH₂Cl₂/CH₃OH 9:1)

Schmelzpunkt: 255°C

Elementaranalyse:

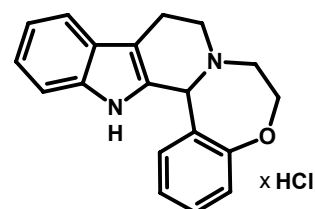
gemessen:

C(%) = 64,35; H(%) = 6,07; N(%) = 7,90

berechnet für C₁₉H₁₉ClN₂O x ³/₂ H₂O:

C(%) = 64,49; H(%) = 6,27; N(%) = 7,92

IR-Daten (KBr, cm⁻¹): 3289, 3173, 3112, 2903, 2800, 2771, 2697, 2636, 1601, 1495, 1451, 1282, 760, 740



¹H-NMR 250 MHz in DMSO-*d*₆

δ [ppm]	Multiplizität (J [Hz])	Integration	Zuordnung
3,15-3,21	m	2 H	Indol-CH ₂
3,43-3,62	m	2 H	CH ₂ -NH-CH ₂
3,81-3,97	m	2 H	CH ₂ -NH-CH ₂
4,22-4,26	t (4,5)	2 H	Ph-O-CH ₂
6,22	s	1H	Indol-CH-Ph
7,02-7,21	m	5 H	arom.
7,30-7,33	dd (7,7)	1 H	arom.
7,46-7,57	m	2 H	arom.

¹³C-NMR+DEPT in MeOD (Hydrochlorid)

δ [ppm]	Zuordnung	δ [ppm]	Zuordnung
18,22	Indol-CH ₂	121,11	arom., C2
40,20	CH ₂ -NH-CH ₂	122,16	arom., quart.
51,71	Indol-CH-Ph	122,20	arom., C13
59,82	CH ₂ -NH-CH ₂	125,89	arom., quart.
70,05	Ph-O-CH ₂	126,86	arom., quart.
107,46	arom., quart.	130,66	arom., C3
111,01	arom., C14	131,71	arom., C1
112,59	arom., C4	136,99	arom., quart., C4a

δ [ppm]	Zuordnung
117,72	arom., C11
119,19	arom., C12

δ [ppm]	Zuordnung
156,97	arom., quart., C14a

G.2.3 8-Methyl-6,7,9,10,15,15b-hexahydroindolo[2',3':3,4]pyrido[1,2-d][1,4]-benzoxazepin-8-iumiodid (FM6)

Einer Lösung von 0,87g (3mmol) der freien Base von 6,7,9,10,15,15b-Hexahydro-indolo[2',3':3,4]pyrido[1,2-d][1,4]benzoxazepinhydrochlorid (FM5) in Acetonitril, werden unter Rühren 1,5ml (24mmol) Methyljodid zugesetzt. Nach 12 Stunden wird die Flüssigkeit im Vakuum abgedampft, der Rückstand in 5ml Methanol gelöst und die Lösung langsam unter kräftigem Rühren in 300ml eisgekühlten Diethylether getropft. Der gelbe, sich zusammenballende Niederschlag ergibt, nach Filtrieren und Trocknen im Vakuum, einen gelbbraunen, sehr porösen, hygroskopischen Feststoff, der ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt wird.

MG: $C_{20}H_{21}IN_2O$ (432,3g/mol)

Ausbeute: 0,49g (38%) hellgelber, poröser Feststoff

Schmelzpunkt: 165-170°C

Elementaranalyse:

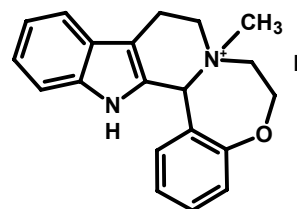
gemessen: $C(\%) = 51,73$; $H(\%) = 5,54$; $N(\%) = 6,30$

berechnet für $C_{20}H_{21}IN_2O \times \frac{5}{3} H_2O$: $C(\%) = 51,96$; $H(\%) = 5,31$; $N(\%) = 6,06$

IR-Daten (KBr, cm^{-1}): 3389, 3055, 2927, 1602, 1491, 1454, 1250, 752

1H -NMR 250 MHz in $DMSO-d_6$

δ [ppm]	Multiplizität (J [Hz])	Integration	Zuordnung
2,91	m	2H	Indol-CH ₂
3,11-3,26	m	3H	N-CH ₃
3,56-3,87	m	4H	CH ₂ -N-CH ₂
4,14-4,18	m	2H	Ph-O-CH ₂
6,14-6,46	m	1H	Indol-CH-Ph
6,89-7,15	m	4H	arom.
7,12-7,31	m	2H	arom.
7,50-7,59	m	2H	arom.
10,87-10,94	m	1H	Indol NH



G.2.4 8-Methyl-7,8,9,10,15,16-hexahydro-6H-indolo[3,2-g][1,4]benzoxazacycloundecan (FM7)

In einem in flüssigem Stickstoff gekühlten 100ml Dreihalskolben, der mit einem Gaseinleitungsrohr, einem Luftballon zur Druckregulation und einem Stopfen verschlossen ist, wird Ammoniakgas einkondensiert, bis dieser zu zwei Dritteln gefüllt ist. Das Kühlbad wird entfernt und nach Verflüssigen des Ammoniaks (-40°C) werden unter Rühren 0,3g (0,69mmol) 8-Methyl-6,7,9,10,15,15b-hexahydroindolo[2',3':3,4]pyrido[1,2-d][1,4]benzoxazepin-8-iumiodid (FM6) zugesetzt. Der Ansatz wird unter Rühren mit reiskorngroßen Stücken elementarem Natrium versetzt bis die tiefblaue Farbe bestehen bleibt. Die Reaktion wird 5 Minuten nach Beenden der Natriumzugabe durch Zugabe eines Tropfens gesättigter Ammoniumchloridlösung abgebrochen. Nach Abdampfen des Ammoniaks bei Raumtemperatur unter Stickstoffbegasung wird der Rückstand in 10ml Wasser aufgenommen und dreimal mit je 20ml Diethylether extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt, über

Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Die Trocknung im Vakuum führt zu einem festen hellgelben Schaum. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch über Kieselgel 60 mit Ethylacetat/Ethanol (1:1) gereinigt.

MG: $C_{20}H_{22}N_2O$ (306,4g/mol)

Ausbeute: 36mg (17%) brauner, amorpher Feststoff

R_f : 0,23 (CH_2Cl_2/CH_3OH 1:1)

Schmelzpunkt: 135-140°C

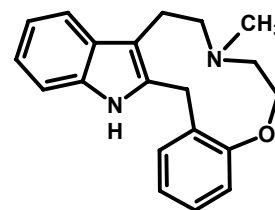
Elementaranalyse (Hydrochlorid):

gemessen:

C(%) = 63,14; H(%) = 6,96; N(%) = 7,22

berechnet für $C_{20}H_{23}ClN_2O \times 2H_2O$: C(%) = 63,40; H(%) = 7,18; N(%) = 7,39

IR-Daten (KBr, cm^{-1}), (Hydrochlorid): 3396, 2927, 2684, 1601, 1492, 1455, 1384, 1248, 750



1H -NMR 250 MHz in $CDCl_3$

δ [ppm]	Multiplizität (J [Hz])	Integration	Zuordnung
2,33-2,43	m	2H+3H	Indol- CH_2 N- CH_3
2,50-2,67	m	2H	N- CH_2
2,96-3,08	m	2H	N- CH_2
4,03-4,15	m	2H+2H	Ph-O- CH_2 Indol- CH_2 -Ph
6,81-6,92	m	2H	arom.
6,70-7,26	m	5H	arom.
7,48-7,51	m	1H	arom.
9,17	s	1H	Indol NH

^{13}C -NMR+DEPT in $CDCl_3$

δ [ppm]	Zuordnung	δ [ppm]	Zuordnung
22,77	Indol- CH_2	118,74	arom., C12
27,27	Indol- CH_2 -Ph	120,84	arom., C13
45,33	N- CH_3	121,16	arom., C2
60,55	N- CH_2	127,89	arom.
61,07	N- CH_2	128,16	arom., C15c
69,18	Ph-O- CH_2	128,18	arom., C10b
108,72	arom., C10a	130,49	arom.
110,62	arom., C4	134,67	arom., C15a
111,41	arom., C14	135,57	arom., C14a
117,96	arom., C11	156,14	arom., C4a

G.2.5 2-(2-Hydroxyethoxy)-N-[2-(3-methoxyphenyl)ethyl]benzamid (FM9)

A) 2,3g (15mmol) 3-Methoxyphenylethylamin werden mit der äquivalenten Menge 2,3-Dihydro-5H-1,4-benzodioxepin-5-on [2,5g (15mmol)] gemischt und unter Stickstoffbegasung bei 70°C gerührt. Nach 46 Stunden sind die Edukte vollständig umgesetzt. Man erhält ein hellgelbes, honigartiges Produkt, welches nach einigen Tagen im Kühlschrank langsam zu einem hellgelben Feststoff von wachsartigem Aussehen kristallisiert und keiner weiteren Aufreinigung bedarf.

MG: C₁₈H₂₁NO (315,4g/mol)

Ausbeute: 4,7g (100%) hellgelber, wachsartiger Feststoff

R_f: 0,61(CH₂Cl₂/CH₃OH 9:1)

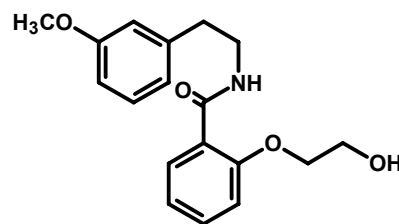
Schmelzpunkt: 109°C

Elementaranalyse:

gemessen: C(%) = 68,05; H(%) = 6,76; N(%) = 4,23

berechnet für C₁₈H₂₁NO: C(%) = 68,55; H(%) = 6,71; N(%) = 4,44

IR-Daten (KBr, cm⁻¹): 3359, 3059, 3015, 2958, 2942, 2874, 2836, 1638, 1547, 1484-1452, 1245, 1041, 760



¹H-NMR 250 MHz in DMSO-*d*₆

δ [ppm]	Multiplizität (J [Hz])	Integration	Zuordnung
2,79-2,85	t (7,4)	2H	Ph-CH ₂
3,49-3,57	dt (6,7)	2H	CH ₂ -NH
3,68-3,77	m	2H+3H	CH ₂ -OH, O-CH ₃
4,11-4,15	t (4,7)	2H	Ph-O-CH ₂
5,10	s br	1H	OH
6,74-6,84	m	3H	arom., H4', H2', H6'
7,01-7,07	t (J = 7,5)	1H	arom., H4
7,12-7,16	d (J = 8,4)	1H	arom., H3
7,16-7,23	t (J = 8,1)	1H	arom., H5
7,41-7,48	dt (6,5)	1H	arom., H5'
7,82-7,86	dd (J = 1,7; 7,8)	1H	arom., H6
8,46-8,50	t (5,3)	1H	NH

¹³C-NMR+DEPT in DMSO-*d*₆

δ [ppm]	Zuordnung	δ [ppm]	Zuordnung
35,49	Ph-CH ₂	121,40	arom., C5
41,04	CH ₂ -NH	123,14	arom., quart., C1
55,31	O-CH ₃	129,78	arom., C5'
59,74	CH ₂ -OH	131,24	arom., C4
71,28	Ph-O-CH ₂	132,85	arom., C6
112,09	arom., C2'	141,49	arom., quart., C1'
114,42	arom., C3	157,11	arom., quart., C2
114,64	arom., C4'	159,75	arom., quart., C3'
121,27	arom., C6'	164,98	arom., quart., C=O

B) 3,1g (19mmol) 3-Methoxyphenylethylamin und 2,8g (19mmol) 2,3-Dihydro-5*H*-1,4-benzodioxepin-5-on werden in 5ml Toluol gelöst und unter Rühren in Stickstoffatmosphäre 19 Stunden zum Rückfluss erhitzt. Nach Ablauf der Reaktionszeit wird das Lösemittel im Vakuum entfernt. Das hellgelbe Produkt von honigartiger Konsistenz kristallisiert unter Kühlung langsam aus und kann ohne Aufreinigung weiterverarbeitet werden.

Ausbeute: 6g (100%) hellgelber, wachsartiger Feststoff

Die analytischen Daten stimmen mit den unter **A** angegebenen Werten überein.

G.2.6 12-Methoxy-6,7,10,14b-tetrahydro-9H-isochino[2,1-d][1,4]benzoxazepin-hydrochlorid (FM10)

4,1g (13mmol) 2-(2-Hydroxyethoxy)-N-[2-(3-methoxyphenyl)ethyl]benzamid werden nach Lösen in 80ml Acetonitril und Zugabe von 10ml Phosphorylchlorid für 18 Stunden unter Rühren zum Rückfluss erhitzt. Anschließend werden Lösungsmittel und Phosphorylchlorid im Vakuum entfernt und das zurückbleibende hellbraune Öl mehrmals mit heißem Petrolether gewaschen, bis kein Phosphorylchloridgeuch mehr wahrnehmbar ist. Der ölige Rückstand wird in 250ml Methanol gelöst, die Lösung unter Rühren und Eiskühlung langsam mit 3g Natriumborhydrid versetzt und nach Abklingen der Reaktion eine Stunde zum Rückfluss erhitzt. Der Ansatz wird bis zur sirupösen Konsistenz im Vakuum eingeeengt, in wenig Wasser aufgenommen und die alkalische Wasserphase dreimal mit je 40ml Ethylacetat extrahiert. Vereinigen der organischen Phasen, Trocknen über Natriumsulfat, Filtrieren und Abdampfen des Lösemittels im Vakuum führt zu einem hellgelben Schaum. Nach Lösen des Rohproduktes in Diethylether/Isopropanol (4:1) und Versetzen mit einigen Tropfen etherischer Salzsäure setzt sich ein braunes Öl ab, was nach einigen Tagen langsam kristallisiert. Der beige Feststoff wird abfiltriert; aus Isopropanol umkristallisiert und nach Waschen mit Aceton und Diethylether im Vakuum getrocknet.

MG: $C_{18}H_{20}ClNO_2$ (317,8g/mol)

Ausbeute: 1,8g (43%), beiger Feststoff

R_f: (Base) 0,79 (CH_2Cl_2/CH_3OH 9:1)

Schmelzpunkt: 225-230°C

Elementaranalyse:

gemessen: C(%) = 58,24; H(%) = 5,93; N(%) = 3,53

berechnet für $C_{18}H_{20}ClNO_2 \times 3H_2O$: C(%) = 58,14; H(%) = 7,05; N(%) = 3,77

IR-Daten (KBr, cm^{-1}): 3424, 3070, 2951, 2889, 2618, 1505, 1451, 1246, 777



1H -NMR 250 MHz in $DMSO-d_6$

δ [ppm]	Multiplizität (J [Hz])	Integration	Zuordnung
3,00-3,38	m	4H	$CH_2-NH-CH_2$
3,72	s	3H	O- CH_3
3,92-3,96	t (5,1)	2H	Ph- CH_2
4,21-4,40	m	2H	Ph-O- CH_2
5,80	s br	1H	Ph- CH_2 -Ph
6,60-6,64	d (8,6)	1H	arom., H13
6,71-6,75	dd (2,1; 8,6)	1H	arom., H4
6,83-6,84	ds (1,7)	1H	arom., H11
6,96-7,02	t (7,5)	1H	arom., H3
7,14-7,17	d (8,0)	2H	arom., H1; H14
7,37-7,44	t (7,7)	1H	arom., H2
10,48	s	1H	NH

^{13}C -NMR+DEPT in $DMSO-d_6$

δ [ppm]	Zuordnung	δ [ppm]	Zuordnung
25,66	Ph- CH_2	121,57	arom., C2
39,97	$CH_2-NH-CH_2$	124,32	arom., quart., C14c
43,21	$CH_2-NH-CH_2$	125,81	arom., quart., C14a
53,17	Ph-CH-Ph	128,79	arom., C14
55,62	O- CH_3	131,25	arom., C3

δ [ppm]	Zuordnung
69,05	O-CH ₂
113,31	arom., C13
113,43	arom., C4
113,78	arom., C11

δ [ppm]	Zuordnung
131,37	arom., C1
134,54	arom., quart., C10a
156,30	arom., quart., C5
158,87	arom., quart., C12

G.2.7 Ethyl-12-methoxy-6,7,10,15-tetrahydrodibenzo[*g,j*][1,4]oxaza-cycloundecan-8(9*H*)carboxylat (FM13)

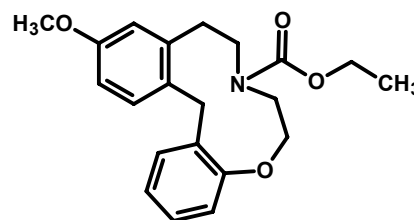
Eine Lösung von 0,99g (3,5mmol) 12-Methoxy-6,7,10,14b-tetrahydro-9*H*-isochino[2,1-*d*][1,4]-benzoxazepin (FM10) in 200ml trockenem THF wird in einem Methanol/Trockeneisbad unter Stickstoffatmosphäre auf -76°C gekühlt. Über ein Septum wird die Lösung unter Rühren, tropfenweise mit 2ml Chlorameisensäureethylester versetzt, für 4 Stunden im Kühlbad weitergerührt und danach eine Lösung von 0,9g Natriumcyanoborhydrid in 20ml trockenem THF zugegeben. Das Gemisch wird über Nacht gerührt und dabei langsam auf Raumtemperatur gebracht. Anschließend wird mit 100ml 2N Natronlauge alkalisiert, das THF im Vakuum entfernt und die Wasserphase dreimal mit je 40ml Diethylether extrahiert. Nach Trocknen der organischen Phase über Natriumsulfat und Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum und säulenchromatographischer Reinigung über Kieselgel 60 mit Hexan/Chloroform/Ethylacetat (5:2:1,5) erhält man das Produkt als farbloses Öl. (Das Produkt wurde nicht in elementaranalytischer Reinheit erhalten.)

MG: C₂₁H₂₅NO₄ (355,4g/mol)

Ausbeute: 46mg (3,7%) farbloses Öl

R_f: 0,83 (CH₂Cl₂/CH₃OH 9:1)

IR-Daten (KBr, cm⁻¹): 3449, 2977, 2929, 1707, 1217, 669



¹H-NMR 250 MHz in CDCl₃

δ [ppm]	Multiplizität (J [Hz])	Integration	Zuordnung
1,20-1,26	t (7,2)	3H	O-CH ₂ -CH ₃
2,76-2,82	t (7,2)	2H	Ph-CH ₂ -CH ₂ -N
3,31-3,34	dt (6,5)	2H	Ph-CH ₂ -CH ₂ -N
3,76-3,81	m	2H+3H	N-CH ₂ -CH ₂ -O O-CH ₃
3,96-3,99	br s	2H	Ph-CH ₂ -Ph
4,06-4,14	q (7,1)	2H	O-CH ₂ -CH ₃
4,22-4,27	dt (5,7)	2H	N-CH ₂ -CH ₂ -O
6,68-6,74	m	2H	arom., H4, H11
6,82-6,92	m	3H	arom., H1, H2, H13
6,98-7,04	m	1H	arom., H14
7,14-7,21	m	1H	arom., H3

¹³C-NMR+DEPT+HSQC in CDCl₃

δ [ppm]	Zuordnung
14,63	O-CH ₂ -CH ₃
31,80	Ph-CH ₂ -Ph
33,35	Ph-CH ₂ -CH ₂ -N
41,31	Ph-CH ₂ -CH ₂ -N
42,09	N-CH ₂ -CH ₂ -O
55,20	O-CH ₃

δ [ppm]	Zuordnung
121,27	arom., C2
127,27	arom., C3
130,06	arom., quart., C15a
130,14	arom., C1
130,77	arom., quart., C10a
131,48	arom., C14

δ [ppm]	Zuordnung
61,13	O-CH ₂ -CH ₃
68,24	N-CH ₂ -CH ₂ -O
111,53	arom., C13
111,84	arom., C4
115,86	arom., C11

δ [ppm]	Zuordnung
138,40	arom., quart., C14a
155,74	arom., quart., C=O
156,54	arom., quart., C12
158,12	arom., quart., C4a

G.2.8 3-Benzoyloxynitrostyren (FM2)

25g (118mmol) 3-Benzoyloxybenzaldehyd werden in 60ml Eisessig gelöst und nach Zusatz von 12ml Nitromethan und 6ml Cyclohexylamin 4 Stunden auf 100°C erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird das Gemisch in Eiswasser gegossen und der sich abscheidende gelbe Feststoff abfiltriert und getrocknet. Das Produkt wird aus Methanol umkristallisiert.

MG: C₁₅H₁₃NO₃ (255,3g/mol)

Ausbeute: 12,3g (41%) gelbe Nadeln

R_f: 0,86 (CH₂Cl₂/CH₃OH 9:1)

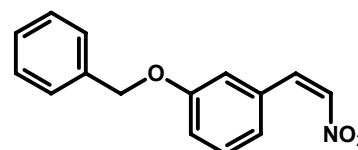
Schmelzpunkt: 96°C, Literaturwert 93°C [Kondo, Ishiwata, 1931]

Elementaranalyse:

gemessen: C(%) = 70,59; H(%) = 5,03; N(%) = 5,21

berechnet für C₁₅H₁₃NO₃: C(%) = 70,58; H(%) = 5,13; N(%) = 5,49

IR-Daten (KBr, cm⁻¹): 3442, 3119, 1634, 1582, 1466, 1275, 835, 787, 754



¹H-NMR 250 MHz in CDCl₃

δ [ppm]	Multiplizität (J [Hz])	Integration	Zuordnung
5,11	s	2H	Ph-CH ₂ -O
7,11-7,17	m	4H	arom., Ph-CH ₂ -O-Ph
7,34-7,47	m	5H	arom., Ph-CH ₂ -O-Ph
7,52-7,58	d (13,7)	1H	Ph-CH=CH-NO ₂
7,93-7,99	d (13,7)	1H	Ph-CH=CH-NO ₂

G.2.9 2-[3-(Benzyloxy)phenyl]ethylamin (FM3)

Eine eisgekühlten Suspension von 11,7g Lithiumaluminiumhydrid in 270ml trockenem THF wird unter Rühren und Stickstoffbegasung tropfenweise mit 7,6ml konzentrierter Schwefelsäure versetzt. Anschließend wird eine Lösung von 16,4g (64mmol) 3-Benzoyloxynitrostyren (FM2) in 80ml trockenem THF langsam zum Reaktionsansatz gegeben und nach Entfernen der Kühlung das Gemisch für 5 Minuten zum Rückfluss erhitzt. Danach wird wieder im Eisbad gekühlt und überschüssiges Hydrid durch vorsichtige Zugabe von 45ml Isopropanol gefolgt von 33ml 2N Natronlauge zerstört. Das verfestigte Gemisch wird nach Zusatz von 250ml THF bei Raumtemperatur 30 Minuten gerührt, ausgeschiedene Salze abfiltriert und das Filtrat im Vakuum zur Trockne eingedunstet. Das Produkt bleibt als gelbes Öl zurück.

MG: C₁₅H₁₇NO (227,3g/mol)

Ausbeute: 11,6g (80%) gelbes Öl

R_f: 0,28 (CH₂Cl₂/CH₃OH 9:1)

Elementaranalyse:

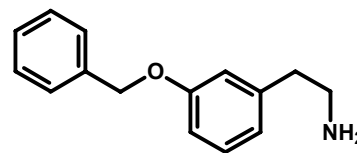
gemessen: C(%) = 77,36; H(%) = 7,40; N(%) = 5,47

berechnet für C₁₅H₁₇NO x ¹/₃H₂O: C(%) = 77,22; H(%) = 7,63; N(%) = 6,00

Elementaranalyse (Trifluoracetat):

gemessen: C(%) = 58,53; H(%) = 5,95; N(%) = 4,35

berechnet für C₁₇H₁₈F₃NO₃ x ¹/₂H₂O: C(%) = 58,28; H(%) = 5,47; N(%) = 4,00



IR-Daten (KBr, cm⁻¹): 3395, 3033, 2933, 2869, 1590, 1454, 1256, 796, 741, 689

¹H-NMR 250 MHz in MeOD

δ [ppm]	Multiplizität (J [Hz])	Integration	Zuordnung
2,91-2,97	t (7,7)	2H	Ph-CH ₂
3,15-3,21	dt (8,0)	2H	CH ₂ -NH
5,09	s	2H	Ph-CH ₂ -O
6,56-6,94	m	3H	arom.
7,23-7,46	m	6H	arom.

G.2.10 N-{2-[3-(Benzyloxy)phenyl]ethyl}-2-(2-hydroxyethoxy)benzamid (FM14)

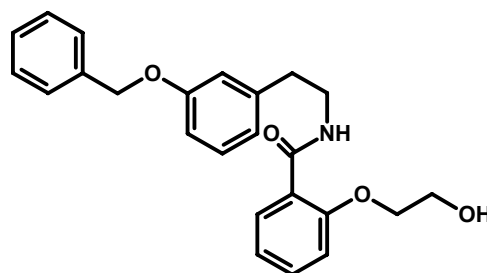
3,4g (15mmol) 2-[3-(Benzyloxy)phenyl]ethylamin und 2,5g (15mmol) 2,3-Dihydro-5H-1,4-benzodioxepin-5-on werden in 50 ml Toluol gelöst und 48 Stunden unter Stickstoffbegasung zum Rückfluss erhitzt. Nach Entfernen des Lösemittels im Vakuum bleibt ein gelbes, zähflüssiges Öl zurück, welches im Kühlschrank langsam (3 Wochen) zu einem wachsartig aussehenden Feststoff kristallisiert. Umkristallisieren aus Methanol führt zu weißen Kristallnadeln, die abfiltriert und im Vakuum getrocknet werden.

MG: C₂₄H₂₅NO₄ (391,5g/mol)

Ausbeute: 3,3g (56%) weiße Nadeln

R_f: 0,69 (CH₂Cl₂/CH₃OH 9:1)

Schmelzpunkt: 98°C



Elementaranalyse:

gemessen: C(%) = 73,82; H(%) = 6,41; N(%) = 3,23

berechnet für C₂₄H₂₅NO₄: C(%) = 74,05; H(%) = 6,71; N(%) = 3,45

IR-Daten (KBr, cm⁻¹): 3366, 3060, 3032, 2946, 2927, 2872, 1634, 1520, 1452, 1243, 1086, 757, 728, 699

¹H-NMR 250 MHz in DMSO-*d*₆

δ [ppm]	Multiplizität (J [Hz])	Integration	Zuordnung
2,79-2,85	t (7,4)	2H	Ph-CH ₂ -CH ₂ -NH
3,50-3,58	dt (6,7)	2H	Ph-CH ₂ -CH ₂ -NH
3,70-3,76	q (4,6; 5,0)	2H	O-CH ₂ -CH ₂ -OH
4,11-4,15	t (4,8)	2H	O-CH ₂ -CH ₂ -OH
5,05	s	2H	Ph-CH ₂ -O
5,09-5,14	t (5,1)	1H	OH
6,83-6,86	d (8,0)	2H	arom.
6,93	s	1H	arom., H2'
7,01-7,07	t (7,9)	1H	arom.
7,13-7,24	m	2H	arom.
7,30-7,48	m	6H	arom.
7,83-7,87	dd (1,7; 5,9)	1H	arom.
8,46-8,51	t (5,5)	1H	NH

¹³C-NMR+DEPT in DMSO-*d*₆

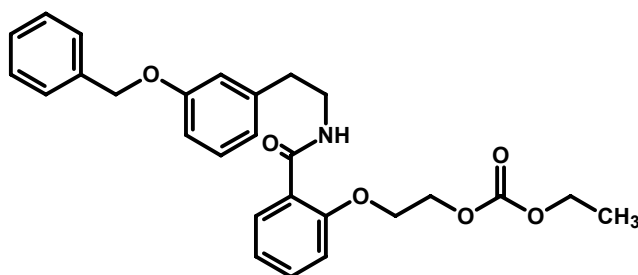
δ [ppm]	Zuordnung	δ [ppm]	Zuordnung
35,48	Ph-CH ₂ -CH ₂ -NH	128,09	arom.
41,00	Ph-CH ₂ -CH ₂ -NH	128,21	arom.
59,76	O-CH ₂ -CH ₂ -OH	128,84	arom.
69,54	Ph-CH ₂ -O	129,82	arom., C5'
71,29	O-CH ₂ -CH ₂ -OH	131,25	arom., C4
112,90	arom., C3	132,85	arom., C6
114,43	arom., C4'	137,62	arom., quart., C1''
115,59	arom., C2'	141,55	arom., quart., C1'
121,40	arom.	157,11	arom., quart., C2
121,54	arom.	158,90	arom., quart., C3'
123,17	arom., quart., C1	164,96	C=O

G.2.11 2-{2-[(2-[3-(Benzyloxy)phenyl]ethyl)amino]carbonyl]phenoxy}ethyl-ethylcarbonat (FM28)

Zu einer eisgekühlten Lösung von 1,9g (4,9mmol) *N*-{2-[3-(Benzyloxy)phenyl]ethyl}-2-(2-hydroxyethoxy)benzamid (FM14) in 20ml trockenem Pyridin werden langsam, unter Rühren und Stickstoffbegasung 0,6ml Chlorameisensäureethylester getropft. Es wird 15 Stunden gerührt und der Ansatz dabei langsam auf Raumtemperatur gebracht. Das Gemisch wird mit 50ml Dichlormethan versetzt und mehrfach mit je 20 ml 2N Salzsäure ausgeschüttelt, bis die Wasserphase sauer bleibt. Anschließend wird noch zweimal mit je 20ml 20%iger Natronlauge gewaschen. Nach Trocknen der organischen Phase über Natriumsulfat und Abdampfen des Lösemittels im Vakuum verbleibt das gelbe, ölige Produkt.

MG: C₂₇H₂₉NO₆ (463,5g/mol)

Ausbeute: 1,85g (82%), gelbes Öl

R_f: 0,85 (CH₂Cl₂/CH₃OH 95:5)

Elementaranalyse:

gemessen: C(%) = 69,59; H(%) = 6,41; N(%) = 2,91

berechnet für C₂₇H₂₉NO₆: C(%) = 69,96; H(%) = 6,31; N(%) = 3,02

IR-Daten (KBr, CHCl_3 cm^{-1}): 3683, 3410, 1747, 1644, 1534, 1450, 1027, 689

$^1\text{H-NMR}$ 250 MHz in $\text{DMSO-}d_6$

δ [ppm]	Multiplizität (J [Hz])	Integration	Zuordnung
1,12-1,18	t (7,1)	3H	$\text{O-CH}_2\text{-CH}_3$
2,77-2,83	t (7,4)	2H	$\text{Ph-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$
3,48-3,56	dt (6,6)	2H	$\text{Ph-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$
4,05-4,14	dq (7,0; 7,2)	2H	$\text{O-CH}_2\text{-CH}_3$
4,28-4,32	dt (3,1)	2H	$\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$
4,39-4,43	dt (3,5)	2H	$\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$
5,05	s	2H	$\text{Ph-CH}_2\text{-O}$
6,80-6,89	m	3H	arom., H_2' , H_4' , H_6'
7,03-7,49	m	9H	arom.
7,79-7,83	dd (1,9; 7,6)	1H	arom., H_3
8,13-8,18	t (5,7)	1H	NH

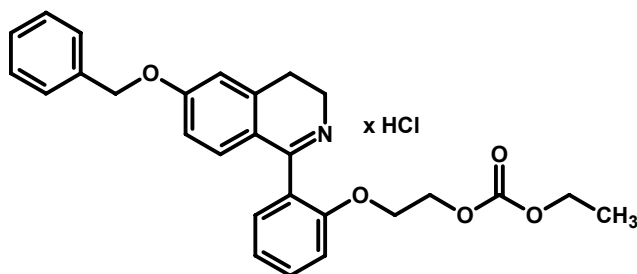
G.2.12 2-{2-[6-(Benzyloxy)-3,4-dihydroisochinolin-1-yl]phenoxy}ethyl-ethylcarbonat-hydrochlorid (FM29)

Eine Lösung von 1,8g (4mmol) 2-{2-[(2-[3-(Benzyloxy)phenyl]ethyl)amino]carbonyl]-phenoxy}ethyl-ethylcarbonat (FM28) in 60ml Acetonitril wird mit 3,5ml Phosphorylchlorid versetzt und unter Stickstoffbegasung für 6 Stunden zum Rückfluss erhitzt. Nach Abrotieren der Lösungsmittel bleibt ein bernsteinfarbenes Öl zurück, welches in 100ml siedender 2N Salzsäure aufgenommen wird. Die auf Raumtemperatur abgekühlte Wasserphase wird dreimal mit je 50ml Diethylether gewaschen und anschließend dreimal mit je 50ml Dichlormethan extrahiert. Nach Trocknen der Dichlormethanphase über Natriumsulfat und Entfernen des Lösemittels im Vakuum bleibt das Produkt als gelbes, zähes Öl zurück.

MG: $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{ClNO}_5$ (482,0g/mol)

Ausbeute: 1,83g (95%) gelbes Öl

R_f : 0,38 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ 95:5)



Elementaranalyse:

gemessen: C(%) = 64,19; H(%) = 5,84; N(%) = 2,67

berechnet für $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{ClNO}_5 \times \text{H}_2\text{O}$: C(%) = 64,86; H(%) = 6,05; N(%) = 2,80

IR-Daten (KBr, cm^{-1}): 3422, 2926, 1743, 1599, 1449, 1363, 1260, 1022, 757

$^1\text{H-NMR}$ 250 MHz in $\text{DMSO-}d_6$

δ [ppm]	Multiplizität (J [Hz])	Integration	Zuordnung
1,08-1,13	t (7,0)	3H	CH_3
3,14-3,21	t (7,7)	2H	$\text{Ph-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$
3,90-4,01	m	4H	$\text{Ph-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$, $\text{O-CH}_2\text{-CH}_3$
4,23	s	4H	$\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$
5,27	s	2H	$\text{Ph-CH}_2\text{-O}$
7,01-7,06	dd (2,5; 6,4)	1H	arom.

δ [ppm]	Multiplizität (J [Hz])	Integration	Zuordnung
7,17-7,52	m	10H	arom.
7,65-7,72	dt (1,5; 7,2)	1H	arom.
13,25	s br	1H	NH

G.2.13 2-{2-[6-(Benzyloxy)-3,4-dihydroisochinolin-1-yl]phenoxy}ethanolhydrochlorid (FM30)

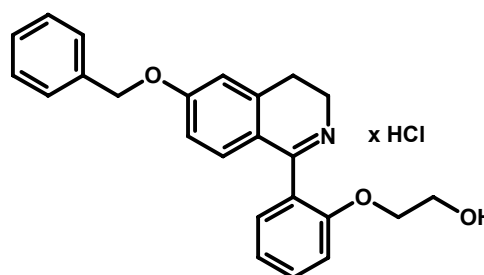
1,75g (3,6mmol) 2-{2-[6-(Benzyloxy)-3,4-dihydroisochinolin-1-yl]phenoxy}ethyl-ethylcarbonathydrochlorid (FM29) werden in 40ml einer 20-prozentigen ethanolischen Kaliumhydroxidlösung bei Raumtemperatur 16 Stunden gerührt. Anschließend wird im Vakuum auf die Hälfte eingengt und mit 2N Salzsäure angesäuert. Nach viermaligem Extrahieren der Wasserphase mit Dichlormethan, Trocknen der organischen Phase über Natriumsulfat und Abdampfen des Lösemittels im Vakuum erhält man das Produkt als gelben Schaum.

MG: $C_{24}H_{24}ClNO_3$ (409,9g/mol)

Ausbeute: 1,4g (94%) gelber, amorpher Feststoff

R_f : 0,73 (EtOH)

Schmelzpunkt: 68-71°C



Elementaranalyse:

gemessen: $C(\%) = 67,42$; $H(\%) = 6,12$; $N(\%) = 3,06$

berechnet für $C_{24}H_{24}ClNO_3 \times H_2O$: $C(\%) = 67,36$; $H(\%) = 6,12$; $N(\%) = 3,27$

IR-Daten (KBr, cm^{-1}): 3396, 2923, 1599, 1448, 1362, 1258, 1021, 757

1H -NMR 250 MHz in $DMSO-d_6$

δ [ppm]	Multiplizität (J [Hz])	Integration	Zuordnung
3,15-3,21	t (7,7)	2H	Ph-CH ₂ -CH ₂ -NH
3,47-3,51	t (5,0)	2H	CH ₂ -OH
3,90-3,97	t (7,7)	2H	Ph-CH ₂ -CH ₂ -NH,
4,03-4,07	t (5,0)	2H	Ph-O-CH ₂
5,27	s	2H	Ph-CH ₂ -O
7,02-7,07	dd (2,3; 6,6)	1H	arom.
7,14-7,26	m	3H	arom.
7,31-7,48	m	7H	arom.
7,63-7,70	dt (1,4; 7,2)	1H	arom.

H ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ADHS	Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätssyndrom
B _{max}	maximale Bindungskapazität
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CDCl ₃	deuteriertes Chloroform
CHO-Zellen	Chinese hamster ovarian cells
d	Dublett
dd	Dublett vom Dublett
DEPT	distortionless enhancement of NMR signals by polarization
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO- <i>d</i> ₆	deuteriertes Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid
dt	Dublett vom Triplet
EC ₅₀	mittlere effektorische Konzentration
EPS	extrapyramidal symptoms, extrapyramidal-motorische Nebenwirkungen
GC/MS	Gaschromatograph gekoppelt mit Massenspektrometer
GPCR	G-protein coupled receptors
GTP	Guanosintriphosphat
HCl	Salzsäure
HEK-Zellen	human embryonic kidney cells
HRMS	high resolution mass spectrometry
HSQC	heteronuclear single quantum coherence
5-HT	5-Hydroxytryptamin / Serotonin
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
IR	Infrarot
<i>J</i>	Kopplungskonstante
KBr	Kaliumbromid
K _D	Gleichgewichtsdissoziationskonstante
K _i	Gleichgewichtsinhibitionskonstante
K _p	Kochpunkt
<i>m</i> -	meta-
<i>m</i>	Multiplet
MARTA	multiacting receptor targeted antipsychotics
mc	zentriertes Multiplet
MeOD	deuteriertes Methanol
MG	Molekulargewicht
NaOH	Natronlauge
n _H	Hill-Koeffizient
NMR	nuclear magnetic resonance
<i>o</i> -	ortho-
<i>p</i> -	para-
PBS	phosphate buffered saline
PD	Parkinson's disease, Morbus Parkinson
q	Quartett
R _f	Retentionsfaktor
s	Singulett
SAR	structure activity relationship
Smp	Schmelzpunkt
SSRI	selective serotonin reuptake inhibitor
t	Triplet
THF	Tetrahydrofuran
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
ZNS	Zentralnervensystem

I LITERATURVERZEICHNIS

Abadi, A.H.: Phenylpiperazinylmethylheterocycle derivatives: synthesis and dopamine receptor binding profiles. *Arch. Pharm.* **2004**, 337, 383-390.

Abou El Ella, D.A., Müller, F.K.U.: A new scaffold for D3 dopaminergic affinity containing arylpiperazine fragment: molecular modeling, synthesis, in vitro and in vivo pharmacological evaluation. *Bull. Pharm. Sci.* **2007**, 30, 259-273.

Aktories, K., Förstermann, U., Hofmann, F., Starke, K. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag: München, Germany, 2009.

Awadallah, F.M., Müller, F.K.U., Lehmann, J., Abadi, A.H.: Synthesis of novel lactam derivatives and their evaluation as ligands for the dopamine receptors, leading to a D(4)-selective ligand. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, 15, 5811-5818.

Basova, Yu. G.; Ramsh, S. M.; Ginak, A. I.; Karpovich, A. E.: Study of the reactivity and tautomerism of azolidines. XLIV. Effect of temperature and nucleophile concentration on the ratio of yields of isomeric products of the methylation of the sodium salt of 2-(phenylimino)-4-thiazolidinone by dimethyl sulfate in acetonitrile. *Zh. Org. Khim.* **1982**, 18, 2205-2211.

Bell, F.W., Cantrell, A.S., Hogberg, M., Jaskunas, S.R., Johansson, N.G., Jordan, C.L., Kinnick, M.D., Lind, P., Morin, J.M., Jr., Noreen, R., .: Phenethylthiazolethiourea (PETT) compounds, a new class of HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. 1. Synthesis and basic structure-activity relationship studies of PETT analogs. *J. Med. Chem.* **1995**, 38, 4929-4936.

Berenyi, S., Csutoras, C., Gyulai, S., Rusznyak, G.: Synthesis of new 3-substituted aporphines. *Synth. Commun.* **2001**, 31, 1987-1992.

Bettinetti, L., Schlotter, K., Hübner, H., Gmeiner, P.: Interactive SAR studies: rational discovery of super-potent and highly selective dopamine D3 receptor antagonists and partial agonists. *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 4594-4597.

Bogeso, K.P., Bang-Andersen, B.: Dopamine and serotonin receptor and transporter ligands. In *Textbook of drug design and discovery*, Liljefors, T., Krogsgaard-Larsen, P., Madsen, U., Eds., CRC Press: New York, USA, 2002, pp 299-327.

Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, 72, 248-254.

Brown, A.S., Gershon, S.: Dopamine and depression. *J. Neural Transm. Gen. Sect.* **1993**, 91, 75-109.

Bylund, D.B., Toews, M.L.: Radioligand binding methods: practical guide and tips. *Am. J. Physiol* **1993**, 265, L421-L429.

Calverley, M.J.: Chloroformate ester-induced reductive 1,2-bond cleavage of 1,2,3,4-tetrahydro-beta-carboline derivatives - stereochemistry and application in sequence with an oxidative bond regeneration reaction to the synthesis of indole alkaloids. *J. Chem. Res., Synop.* **1983**, 1848-1890.

Cheng, Y., Prusoff, W.H.: Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* **1973**, 22, 3099-3108.

Chordia, M.D., Murphree, L.J., Macdonald, T.L., Linden, J., Olsson, R.A.: 2-Aminothiazoles: a new class of agonist allosteric enhancers of A(1) adenosine receptors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, 12, 1563-1566.

Clemence, F., Le Martret, O., Delevallee, F., Benzoni, J., Jouanen, A., Jouquey, S., Mouren, M., Deraedt, R.: 4-Hydroxy-3-quinolinecarboxamides with antiarthritic and analgesic activities. *J. Med. Chem.* **1988**, 31, 1453-1462.

Compton, S.J., Jones, C.G.: Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal. Biochem.* **1985**, 151, 369-374.

Cussac, D., Newman-Tancredi, A., Sezgin, L., Millan, M.J.: [3H]S33084: a novel, selective and potent radioligand at cloned, human dopamine D3 receptors. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **2000**, 361, 569-572.

Decker, M.: Synthese und pharmakologische Evaluierung strukturell neuartiger Dopamin-Rezeptor-Liganden vom Azecin- und Azepin-Typ. *Dissertation (Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn)* **2001**.

Decker, M., Lehmann, J.: Dopamine receptor ligands. Part VII [1]: novel 3-substituted 5-phenyl-1, 2, 3, 4, 5, 6-hexahydro-azepino-[4, 5-b]indoles as ligands for the dopamine receptors. *Arch. Pharm.* **2003**, 336, 466-476.

Decker, M., Schleifer, K.J., Nieger, M., Lehmann, J.: Dopamine/serotonin receptor ligands. PART VIII: the dopamine receptor antagonist LE300 – modelled and X-ray structure plus further pharmacological characterization, including serotonin receptor binding, biogenic amine transporter testing and in vivo testings. *Eur. J. Med. Chem.* **2004**, 39, 481-489.

Deupree, J.D., Bylund, D.B.: Basic principles and techniques for receptor binding. *Toxcris Reviews* **2002**, 18.

Di Giovanni, G., Di, M., V, Pierucci, M., Esposito, E.: Serotonin-Dopamine interaction: electrophysiological evidence. *Prog. Brain Res.* **2008**, 172, 45-71.

- Ding, H., Lu, W., Li, H., Yang, L., Zhang, Q., Zhou, C., Wu, X., Baudoin, O., Cai, J., Gueritte, F., Zhao, Y.: Synthesis and biological evaluation of novel compounds related to 1-arylnaphthalene lignans and isoquinolines. *Chem. Biodivers.* **2005**, 2, 1217-1231.
- Dunlop, J., Marquis, K.L., Lim, H.K., Leung, L., Kao, J., Cheesman, C., Rosenzweig-Lipson, S.: Pharmacological profile of the 5-HT(2C) receptor agonist WAY-163909; therapeutic potential in multiple indications. *CNS Drug Rev.* **2006**, 12, 167-177.
- El Subbagh, H., Wittig, T., Decker, M., Elz, S., Nieger, M., Lehmann, J.: Dopamine/serotonin receptor ligands. Part IV [1]: synthesis and pharmacology of novel 3-benzazecines and 3-benzazonines as potential 5-HT_{2A} and dopamine receptor ligands. *Arch. Pharm.* **2002**, 335, 443-448.
- Elworthy, T.R., Ford, A.P., Bantle, G.W., Morgans, D.J., Jr., Ozer, R.S., Palmer, W.S., Repke, D.B., Romero, M., Sandoval, L., Sjogren, E.B., Talamas, F.X., Vazquez, A., Wu, H., Arredondo, N.F., Blue, D.R., Jr., DeSousa, A., Gross, L.M., Kava, M.S., Lesnick, J.D., Vimont, R.L., Williams, T.J., Zhu, Q.M., Pfister, J.R., Clarke, D.E.: N-arylpiperazinyl-N'-propylamino derivatives of heteroaryl amides as functional uroselective alpha 1-adrenoceptor antagonists. *J. Med. Chem.* **1997**, 40, 2674-2687.
- Enzensperger, C.: Ringerweiterung, Hydroxylierung und Methylierung - Neues zu Struktur-Wirkungs-Beziehungen an Dopamin Rezeptor Liganden vom Dibenz- und Benzindoloazecin Typ. *Dissertation (Friedrich-Schiller-Universität Jena)* **2007**.
- Enzensperger, C., Görmemann, T., Pertz, H.H., Lehmann, J.: Dopamine/serotonin receptor ligands. Part 17: a cross-target SAR approach: affinities of azecine-styled ligands for 5-HT(2A) versus D1 and D2 receptors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18, 3809-3813.
- Enzensperger, C., Kilian, S., Ackermann, M., Koch, A., Kelch, K., Lehmann, J.: Dopamine/serotonin receptor ligands. Part 15: oxygenation of the benz-indolo-azecine LE 300 leads to novel subnanomolar dopamine D1/D5 antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007a**, 17, 1399-1402.
- Enzensperger, C., Lehmann, J.: Dopamine/serotonin receptor ligands. 13: homologization of a benzindoloazecine-type dopamine receptor antagonist modulates the affinities for dopamine D(1)-D(5) receptors. *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 6408-6411.
- Enzensperger, C., Müller, F.K.U., Schmalwasser, B., Wiecha, P., Traber, H., Lehmann, J.: Dopamine/serotonin receptor ligands. 16.(1) expanding dibenz[d,g]azecines to 11- and 12-membered homologues. Interaction with dopamine D(1)-D(5) receptors. *J. Med. Chem.* **2007b**, 50, 4528-4533.
- Esposito, E., Di, M., V, Di Giovanni, G.: Serotonin-dopamine interaction: an overview. *Prog. Brain Res.* **2008**, 172, 3-6.
- Fibiger, H.C.: Neurobiology of depression: focus on dopamine. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* **1995**, 49, 1-17.
- Fink, B.E., Mortensen, D.S., Stauffer, S.R., Aron, Z.D., Katzenellenbogen, J.A.: Novel structural templates for estrogen-receptor ligands and prospects for combinatorial synthesis of estrogens. *Chem. Biol.* **1999**, 6, 205-219.
- Frederick, J.A., Meador-Woodruff, J.H.: Effects of clozapine and haloperidol on 5-HT₆ receptor mRNA levels in rat brain. *Schizophr. Res.* **1999**, 38, 7-12.
- Gao, Y.G., Baldessarini, R.J., Kula, N.S., Neumeyer, J.L.: Synthesis and dopamine receptor affinities of enantiomers of 2-substituted apomorphines and their N-n-propyl analogues. *J. Med. Chem.* **1990**, 33, 1800-1805.
- Grauer, S.M., Graf, R., Navarra, R., Sung, A., Logue, S.F., Stack, G., Huselton, C., Liu, Z., Comery, T.A., Marquis, K.L., Rosenzweig-Lipson, S.: WAY-163909, a 5-HT_{2C} agonist, enhances the preclinical potency of current antipsychotics. *Psychopharmacology (Berl)* **2009**, 204, 37-48.
- Hackling, A., Ghosh, R., Perachon, S., Mann, A., Holtje, H.D., Wermuth, C.G., Schwartz, J.C., Sippl, W., Sokoloff, P., Stark, H.: N-(omega-(4-(2-methoxyphenyl)piperazin-1-yl)alkyl)carboxamides as dopamine D₂ and D₃ receptor ligands. *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 3883-3899.
- Hamacher, A., Weigt, M., Wiese, M., Hoefgen, B., Lehmann, J., Kassack, M.U.: Dibenzazecine compounds with a novel dopamine/5HT_{2A} receptor profile and 3D-QSAR analysis. *BMC Pharmacol.* **2006**, 6, 11.
- Hansen, R.L.: Perfluoroalkanesulfonate esters as alkylating agents. *J. Org. Chem.* **1965**, 30, 4322-4324.
- Hargrave, K.D., Hess, F.K., Oliver, J.T.: N-(4-substituted-thiazolyl)oxamic acid derivatives, a new series of potent, orally active antiallergy agents. *J. Med. Chem.* **1983**, 26, 1158-1163.
- Haviv, F., Ratajczyk, J.D., DeNet, R.W., Kerdesky, F.A., Walters, R.L., Schmidt, S.P., Holms, J.H., Young, P.R., Carter, G.W.: 3-[1-(2-Benzoxazolyl)hydrazino]propanenitrile derivatives: inhibitors of immune complex induced inflammation. *J. Med. Chem.* **1988**, 31, 1719-1728.
- Heisler, L.K., Zhou, L., Bajwa, P., Hsu, J., Tecott, L.H.: Serotonin 5-HT(2C) receptors regulate anxiety-like behavior. *Genes Brain Behav.* **2007**, 6, 491-496.
- Hoefgen, B.: Etablierung eines funktionellen Calcium-Assays und seine Anwendung zum Screening potentieller Liganden an humanen klonierten Dopamin-Rezeptoren. *Dissertation (Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn)* **2002**.

Hoefgen, B., Decker, M., Mohr, P., Schramm, A.M., Rostom, S.A., El Subbagh, H., Schweikert, P.M., Rudolf, D.R., Kassack, M.U., Lehmann, J.: Dopamine/serotonin receptor ligands. 10: SAR Studies on azecine-type dopamine receptor ligands by functional screening at human cloned D1, D2L, and D5 receptors with a microplate reader based calcium assay lead to a novel potent D1/D5 selective antagonist. *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 760-769.

Hopkins, A.L., Mason, J.S., Overington, J.P.: Can we rationally design promiscuous drugs? *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2006**, 16, 127-136.

Horacek, J., Bubenikova-Valesova, V., Kopecek, M., Palenicek, T., Dockery, C., Mohr, P., Hoschl, C.: Mechanism of action of atypical antipsychotic drugs and the neurobiology of schizophrenia. *CNS Drugs* **2006**, 20, 389-409.

Hsieh, G.C., Hollingsworth, P.R., Martino, B., Chang, R., Terranova, M.A., O'Neill, A.B., Lynch, J.J., Moreland, R.B., Donnelly-Roberts, D.L., Kolasa, T., Mikusa, J.P., McVey, J.M., Marsh, K.C., Sullivan, J.P., Brioni, J.D.: Central mechanisms regulating penile erection in conscious rats: the dopaminergic systems related to the proerectile effect of apomorphine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2004**, 308, 330-338.

Jaen, J.C., Wise, L.D., Caprathe, B.W., Tecle, H., Bergmeier, S., Humblet, C.C., Heffner, T.G., Meltzer, L.T., Pugsley, T.A.: 4-(1,2,5,6-Tetrahydro-1-alkyl-3-pyridinyl)-2-thiazolamines: a novel class of compounds with central dopamine agonist properties. *J. Med. Chem.* **1990**, 33, 311-317.

Jurczyk, S., Kolaczowski, M., Maryniak, E., Zajdel, P., Pawlowski, M., Tatarczynska, E., Klodzinska, A., Chojnacka-Wojcik, E., Bojarski, A.J., Charakchieva-Minol, S., Duszyńska, B., Nowak, G., Maciag, D.: New arylpiperazine 5-HT(1A) receptor ligands containing the pyrimido[2,1-f]purine fragment: synthesis, in vitro, and in vivo pharmacological evaluation. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 2659-2666.

Kapur, S., Seeman, P.: Antipsychotic agents differ in how fast they come off the dopamine D2 receptors. Implications for atypical antipsychotic action. *J. Psychiatry Neurosci.* **2000**, 25, 161-166.

Kapur, S., Seeman, P.: Does fast dissociation from the dopamine d(2) receptor explain the action of atypical antipsychotics?: A new hypothesis. *Am. J. Psychiatry* **2001**, 158, 360-369.

Kassack, M.U., Hoefgen, B., Decker, M., Eckstein, N., Lehmann, J.: Pharmacological characterization of the benz[d]indolo[2,3-g]azecine LE300, a novel type of a nanomolar dopamine receptor antagonist. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **2002a**, 366, 543-550.

Kassack, M.U., Hoefgen, B., Lehmann, J., Eckstein, N., Quillan, J.M., Sadee, W.: Functional screening of G protein-coupled receptors by measuring intracellular calcium with a fluorescence microplate reader. *J. Biomol. Screen.* **2002b**, 7, 233-246.

Kolls, B.J., Stacy, M.: Apomorphine: a rapid rescue agent for the management of motor fluctuations in advanced Parkinson disease. *Clin. Neuropharmacol.* **2006**, 29, 292-301.

Kondo, H., Ishiwata, S.: Studien zur Synthese der Aporphin-Alkaloide. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1931**, LXIV, 1533.

Koob, G.F.: Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. *Trends Pharmacol. Sci.* **1992**, 13, 177-184.

Kuroki, T., Nagao, N., Nakahara, T.: N Neuropharmacology of second-generation antipsychotic drugs: a validity of the serotonin-dopamine hypothesis. *Prog. Brain Res.* **2008**, 172, 199-212.

Lazareno, S., Birdsall, N.J.: Detection, quantitation, and verification of allosteric interactions of agents with labeled and unlabeled ligands at G protein-coupled receptors: interactions of strychnine and acetylcholine at muscarinic receptors. *Mol. Pharmacol.* **1995**, 48, 362-378.

Lehmann, J., Mohr, P., Schweikert, P.M., Decker, M., Hoefgen, B.: 7-Methyl-5,6,7,8,9,14-hexahydrodibenz[d,g]azecines as high-affinity dopamine antagonists for the treatment of the schizophrenia and procedure for their production. German Patent DE102005025625 A1, **2006**.

Lieben, C.K., Blokland, A., Sik, A., Sung, E., van Nieuwenhuizen, P., Schreiber, R.: The selective 5-HT6 receptor antagonist Ro4368554 restores memory performance in cholinergic and serotonergic models of memory deficiency in the rat. *Neuropsychopharmacology* **2005**, 30, 2169-2179.

Liu, Z., Chen, X., Yu, L., Zhen, X., Zhang, A.: Synthesis and pharmacological investigation of novel 2-aminothiazole-privileged aporphines. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, 16, 6675-6681.

Lober, S., Hübner, H., Gmeiner, P.: Azaindole derivatives with high affinity for the dopamine D4 receptor: synthesis, ligand binding studies and comparison of molecular electrostatic potential maps. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, 9, 97-102.

Lottspeich, F., Zorbas, H. *Bioanalytik*, Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg, 1998.

Marquis, K.L., Sabb, A.L., Logue, S.F., Brennan, J.A., Piesla, M.J., Comery, T.A., Grauer, S.M., Ashby, C.R., Jr., Nguyen, H.Q., Dawson, L.A., Barrett, J.E., Stack, G., Meltzer, H.Y., Harrison, B.L., Rosenzweig-Lipson, S.: WAY-163909 [(7bR,10aR)-1,2,3,4,8,9,10,10a-octahydro-7bH-cyclopenta-[b][1,4]diazepino[6,7,1hi]indole]: A novel 5-hydroxytryptamine 2C receptor-selective agonist with preclinical antipsychotic-like activity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2007**, 320, 486-496.

- McNulty, J., Steere, J.A., Wolf, S.: The ultrasound promoted Knoevenagel condensation of aromatic aldehydes. *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 8013-8016.
- Meise, W., Müller, H.L.: Neue Synthese von Dibenzo[a,h]chinolizinen. *Synthesis* **1976**, 11, 719-721.
- Meise, W., Schlüter, G.: Synthesis of Isoquino[1,2-Alpha][2]Benzazepines. *Liebigs Ann. Chem.* **1987**, 7, 639-641.
- Meltzer, H.Y.: Clinical studies on the mechanism of action of clozapine: the dopamine-serotonin hypothesis of schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)* **1989**, 99 Suppl, S18-S27.
- Meltzer, H.Y.: What's atypical about atypical antipsychotic drugs? *Curr. Opin. Pharmacol.* **2004**, 4, 53-57.
- Meltzer, H.Y., Huang, M.: In vivo actions of atypical antipsychotic drug on serotonergic and dopaminergic systems. *Prog. Brain Res.* **2008**, 172, 177-197.
- Meltzer, H.Y., Li, Z., Kaneda, Y., Ichikawa, J.: Serotonin receptors: their key role in drugs to treat schizophrenia. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **2003**, 27, 1159-1172.
- Mierau, J., Schneider, F.J., Ensinger, H.A., Chio, C.L., Lajiness, M.E., Huff, R.M.: Pramipexole binding and activation of cloned and expressed dopamine D2, D3 and D4 receptors. *Eur. J. Pharmacol.* **1995**, 290, 29-36.
- Millan, M.J., Gobert, A., Newman-Tancredi, A., Audinot, V., Lejeune, F., Rivet, J.M., Cussac, D., Nicolas, J.P., Muller, O., Lavielle, G.: S 16924 ((R)-2-[1-[2-(2,3-dihydro-benzo[1,4] dioxin-5-Yloxy)-ethyl]-pyrrolidin-3yl]-1-(4-fluoro-phenyl)-ethanone), a novel, potential antipsychotic with marked serotonin (5-HT)1A agonist properties: I. Receptorial and neurochemical profile in comparison with clozapine and haloperidol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1998**, 286, 1341-1355.
- Mohr, P.: Neue Dibenz[d,g]azecine als hochaffine Liganden an humanen Dopaminrezeptoren. *Dissertation (Friedrich-Schiller-Universität Jena)* **2005**.
- Mohr, P., Decker, M., Enzensperger, C., Lehmann, J.: Dopamine/serotonin receptor ligands. 12(1): SAR studies on hexahydro-dibenz[d,g]azecines lead to 4-chloro-7-methyl-5,6,7,8,9,14-hexahydrodibenz[d,g]azecin-3-ol, the first picomolar D5-selective dopamine-receptor antagonist. *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 2110-2116.
- Motulsky, H.: The GraphPad guide to analyzing radioligand binding data. *GraphPad Software, Inc.* **1995**, <http://www.graphpad.com/www/radiolig/radiolig.htm>.
- Motulsky, H., Christopoulos, A.: Fitting Models to Biological Data using Linear and Nonlinear Regression - A practical guide to curve fitting. *GraphPad Software, Inc.* **2003**, <http://www.graphpad.com/manuals/prism4/regressionbook.pdf>.
- Muijlwijk-Koezen, J.E., Timmerman, H., Vollinga, R.C., Frijtag von Drabbe, K.J., de Groote, M., Visser, S., IJzerman, A.P.: Thiazole and thiadiazole analogues as a novel class of adenosine receptor antagonists. *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 749-762.
- Murray, P.J., Harrison, L.A., Johnson, M.R., Robertson, G.M., Scopes, D.I.C., Bull, D.R., Graham, E.A., Hayes, A.G., Kilpatrick, G.J., Daas, I.D., Large, C., Sheehan, M.J., Stubbs, C.M., Turpin, M.P.: A novel series of arylpiperazines with high affinity and selectivity for the dopamine D3 receptor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, 5, 219-222.
- Neumeyer, J.L., Baldessarini, R.J., Booth, R.G.: Therapeutic and Diagnostic Agents for Parkinson's Disease. In *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*, Abraham, D.J., Ed., John Wiley & Sons: New York, 2003, pp 711-714.
- Neumeyer, J.L., Gao, Y.G., Kula, N.S., Baldessarini, R.J.: Synthesis and dopamine receptor affinity of (R)-(-)-2-fluoro-N-n-propylnorapomorphine: a highly potent and selective dopamine D2 agonist. *J. Med. Chem.* **1990**, 33, 3122-3124.
- Norman, M.H., Minick, D.J., Rigdon, G.C.: Effect of linking bridge modifications on the antipsychotic profile of some phthalimide and isoindolinone derivatives. *J. Med. Chem.* **1996a**, 39, 149-157.
- Norman, M.H., Navas, F., III, Thompson, J.B., Rigdon, G.C.: Synthesis and evaluation of heterocyclic carboxamides as potential antipsychotic agents. *J. Med. Chem.* **1996b**, 39, 4692-4703.
- Norman, M.H., Rigdon, G.C., Navas, F., III, Cooper, B.R.: Cyclic benzamides as mixed dopamine D2/serotonin 5-HT2 receptor antagonists: potential atypical antipsychotic agents. *J. Med. Chem.* **1994**, 37, 2552-2563.
- Patt, W.C., Hamilton, H.W., Taylor, M.D., Ryan, M.J., Taylor, D.G., Jr., Connolly, C.J., Doherty, A.M., Klutchko, S.R., Sircar, I., Steinbaugh, B.A., : Structure-activity relationships of a series of 2-amino-4-thiazole-containing renin inhibitors. *J. Med. Chem.* **1992**, 35, 2562-2572.
- Phillipson, J.D., Roberts, M.F., Zenk, M.H. *The Chemistry and Biology of Isoquinoline Alkaloids*, Springer-Verlag: Berlin, 1985.
- Pilla, M., Perachon, S., Sautel, F., Garrido, F., Mann, A., Wermuth, C.G., Schwartz, J.C., Everitt, B.J., Sokoloff, P.: Selective inhibition of cocaine-seeking behaviour by a partial dopamine D3 receptor agonist. *Nature* **1999**, 400, 371-375.

Porter, R.H., Benwell, K.R., Lamb, H., Malcolm, C.S., Allen, N.H., Revell, D.F., Adams, D.R., Sheardown, M.J.: Functional characterization of agonists at recombinant human 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} and 5-HT_{2C} receptors in CHO-K1 cells. *Br. J. Pharmacol.* **1999**, 128, 13-20.

Rollema, H., Lu, Y., Schmidt, A.W., Zorn, S.H.: Clozapine increases dopamine release in prefrontal cortex by 5-HT_{1A} receptor activation. *Eur. J. Pharmacol.* **1997**, 338, R3-R5.

Rostom, S.A., Farghaly, A.M., Soliman, F.S., el Semary, M.M., Elz, S., Lehmann, J.: Synthesis and 5-HT_{2A} antagonist activity of derivatives of the novel heterocycles indolo[3,2-d]pyrrolo[3,2-g]azecine and benzo[d]pyrrolo[3,2-g]azecine compared to the benz[d]indolo[2,3-g]azecine derivative LE 300. *Arch. Pharm.* **2001**, 334, 241-247.

Roth, B.L., Ciaranello, R.D., Meltzer, H.Y.: Binding of typical and atypical antipsychotic agents to transiently expressed 5-HT_{1C} receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1992**, 260, 1361-1365.

Roth, B.L., Sheffler, D.J., Kroeze, W.K.: Magic shotguns versus magic bullets: selectively non-selective drugs for mood disorders and schizophrenia. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, 3, 353-359.

Roth, B.L., Tandra, S., Burgess, L.H., Sibley, D.R., Meltzer, H.Y.: D₄ dopamine receptor binding affinity does not distinguish between typical and atypical antipsychotic drugs. *Psychopharmacology (Berl)* **1995**, 120, 365-368.

Rudolf, D.R.: Benz[d]indolo[2,3-g]azecine und Benz[c]indolo[2,3-f]azonine als potentielle Liganden an Dopamin- und Serotoninrezeptoren. *Dissertation (Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn)* **1999**.

Schlüter, G., Meise, W.: Isoquino[1,2-A][2]Benzazepines .2. Preparation of 1-Phenyl-2-Benzazepine Derivatives by Bischler-Napieralski Reaction. *Liebigs Ann. Chem.* **1988**, 9, 833-837.

Schneider, C.S., Mierau, J.: Dopamine autoreceptor agonists: resolution and pharmacological activity of 2,6-diaminotetrahydrobenzothiazole and an aminothiazole analogue of apomorphine. *J. Med. Chem.* **1987**, 30, 494-498.

Schultheiss, D., Stief, C.G.: Drug therapy of erectile dysfunction - the current status. *Urologe* **2003**, 42, 1322-1329.

Schulze, M., Müller, F.K.U., Mason, J.M., Görls, H., Lehmann, J., Enzensperger, C.: Dibenazecine scaffold rebuilding--is the flexibility always essential for high dopamine receptor affinities? *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17, 6898-6907.

Schweikert, P.M.: Dibenzo[d,g]-und Benzo[d]thieno[3,2-g]azecine als potentielle Arzneistoffe zur Behandlung der Schizophrenie. *Dissertation (Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn)* **1999**.

Seeman, P., Van Tol, H.H.: Deriving the therapeutic concentrations for clozapine and haloperidol: the apparent dissociation constant of a neuroleptic at the dopamine D₂ or D₄ receptor varies with the affinity of the competing radioligand. *Eur. J. Pharmacol.* **1995**, 291, 59-66.

Shulgin, A.T., Shulgin, A.: Phikal. A Chemical Love Story. http://www.erowid.org/library/books_online/pihkal/pihkal.shtml **1995**.

Sipos, A., Berenyi, S.: Benzoylation of morphinandienes and new aspects of their acid-catalyzed rearrangement to new aporphines. *Tetrahedron* **2008**, 64, 5851-5860.

Sipos, A., Giran, L., Mittendorfer, H., Schmidhammer, H., Berenyi, S.: Synthesis of 1,4-thiazino- and benzo-1,4-thiazinomorphinans: their acid-catalyzed rearrangement and study of the formation of unexpected oxidation products. *Tetrahedron* **2008a**, 64, 1023-1028.

Sipos, A., Kiss, B., Schmidt, E., Greiner, I., Berenyi, S.: Synthesis and neuropharmacological evaluation of 2-aryl- and alkylapomorphines. *Bioorg. Med. Chem.* **2008b**, 16, 3773-3779.

Sipos, A., Müller, F.K.U., Lehmann, J., Berenyi, S., Antus, S.: Synthesis and pharmacological evaluation of thiazole and isothiazole derived apomorphines. *Arch. Pharm.* **2009a**, 342, 557-568.

Sipos, A., Toth, M., Müller, F.K.U., Lehmann, J., Berenyi, S.: Synthesis and dopamine receptor binding affinity of 4H-thiochromenoapomorphines. *Monatsh. Chem.* **2009b**, 140, 473-478.

Sondergaard, K., Kristensen, J.L., Palner, M., Gillings, N., Knudsen, G.M., Roth, B.L., Begtrup, M.: Synthesis and binding studies of 2-aryl apomorphines. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 4077-4081.

Subramony, J.A.: Apomorphine in dopaminergic therapy. *Mol. Pharm.* **2006**, 3, 380-385.

Sunahara, R.K., Guan, H.C., O'Dowd, B.F., Seeman, P., Laurier, L.G., Ng, G., George, S.R., Torchia, J., Van Tol, H.H., Niznik, H.B.: Cloning of the gene for a human dopamine D₅ receptor with higher affinity for dopamine than D₁. *Nature* **1991**, 350, 614-619.

Surgand, J.S., Rodrigo, J., Kellenberger, E., Rognan, D.: A chemogenomic analysis of the transmembrane binding cavity of human G-protein-coupled receptors. *Proteins* **2006**, 62, 509-538.

Tocris Bioscience: 5-HT receptors. <http://www.tocris.com/pharmacologicalBrowser.php?ItemId=5101> **2010**.

- Toth, M., Gyulai, Z., Berenyi, S., Sipos, A.: Synthesis and Transformation of Thiazolomorphinandienes. *Lett. Org. Chem.* **2007**, *4*, 539-543.
- Trachsel, D., Hadorn, M., Baumberger, F.: Synthesis of fluoro analogues of 3,4-(methylenedioxy)amphetamine (MDA) and its derivatives. *Chem. Biodivers.* **2006**, *3*, 326-336.
- Van Tol, H.H., Bunzow, J.R., Guan, H.C., Sunahara, R.K., Seeman, P., Niznik, H.B., Civelli, O.: Cloning of the gene for a human dopamine D4 receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine. *Nature* **1991**, *350*, 610-614.
- Van Vliet, L.A., Rodenhuis, N., Wikstrom, H., Pugsley, T.A., Serpa, K.A., Meltzer, L.T., Heffner, T.G., Wise, L.D., Lajiness, M.E., Huff, R.M., Svensson, K., Haenen, G.R., Bast, A.: Thiazoloindans and thiazolobenzopyrans: a novel class of orally active central dopamine (partial) agonists. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3549-3557.
- Witt, T.: Zur Synthese, Stereochemie und Pharmakologie fünf- und sechskerniger Chinolizine. *Dissertation (Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn)* **1994**.
- Witt, T., Hock, F.J., Lehmann, J.: 7-Methyl-6,7,8,9,14,15-hexahydro-5H-benz[d]indolo[2,3-g]azecine: a new heterocyclic system and a new lead compound for dopamine receptor antagonists. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 2079-2081.
- Wittig, T.: Dibenz[g,j]-1-oxa-4-azacycloundecene, offenkettige Analoga und verwandte Strukturen als subtypselektive Liganden an humanen klonierten Dopamin-Rezeptoren - Synthese und Pharmakologie. *Dissertation (Friedrich-Schiller-Universität Jena)* **2004**.
- Wittig, T.W., Decker, M., Lehmann, J.: Dopamine/serotonin receptor ligands. 9. Oxygen-containing mid-sized heterocyclic ring systems and nonrigidized analogues. A step toward dopamine D5 receptor selectivity. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 4155-4158.
- Wittig, T.W., Enzensperger, C., Lehmann, J.: Dopamine/serotonin receptor ligands VI. Dibenz[g,j]-1-oxa-4-azacycloundecene and dibenz[d,g]-2-azacycloundecene: Synthesis of two new heterocyclic ring systems as potential ligands for dopamine receptor subtypes. *Heterocycles* **2003**, *60*, 887-898.
- Woolley, M.L., Marsden, C.A., Sleight, A.J., Fone, K.C.: Reversal of a cholinergic-induced deficit in a rodent model of recognition memory by the selective 5-HT6 receptor antagonist, Ro 04-6790. *Psychopharmacology (Berl)* **2003**, *170*, 358-367.
- Yuan, J., Chen, X., Brodbeck, R., Primus, R., Braun, J., Wasley, J.W., Thurkauf, A.: NGB 2904 and NGB 2849: two highly selective dopamine D3 receptor antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 2715-2718.
- Zhang, A., Neumeyer, J.L., Baldessarini, R.J.: Recent progress in development of dopamine receptor subtype-selective agents: potential therapeutics for neurological and psychiatric disorders. *Chem. Rev.* **2007a**, *107*, 274-302.
- Zhang, A., Van Vliet, S., Neumeyer, J.L.: Synthesis of aminothiazole derived morphinans. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 6459-6462.
- Zhang, A., Xiong, W., Hilbert, J.E., DeVita, E.K., Bidlack, J.M., Neumeyer, J.L.: 2-Aminothiazole-derived opioids. Bioisosteric replacement of phenols. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1886-1888.
- Zhang, A., Zhang, Y., Brannan, A.R., Baldessarini, R.J., Neumeyer, J.L.: Advances in development of dopaminergic aporphinoids. *J. Med. Chem.* **2007b**, *50*, 171-181.

PUBLIKATIONSVERZEICHNIS**Manuskripte**

Enzensperger, C., Müller, F.K.U., Schmalwasser, B., Wiecha, P., Traber, H., Lehmann, J.: Expanding dibenz[*d,g*]azecines to 11- and 12-membered homologues – SAR studies with regard to their interaction with dopamine D1-D5 receptors. *J.Med.Chem.* **2007**, *18*, 4528-4533.

Awadallah, F.M., Müller F.K.U., Lehmann, J., Abadi, A.H.: Synthesis of novel lactam derivatives and their evaluation as ligands for dopamine receptors, leading to a D4-selective ligand. *Borg.Med.Chem.* **2007**, *15*, 5811-5818

Abou El Ella, D.A., Müller, F.K.U.: Molecular modeling, synthesis and dopamine antagonistic activity of 6-chloro-benzo[*d*]-thiazole attached to arylpiperazines. *Bil.Pharm.Sci.* **2007**, *30*, 259-273

Sipos, A., Toth, M., Müller, F.K.U., Lehmann, J., Berenyi, S.: Synthesis and dopamine receptor binding affinity of 4*H*-thiochromenoapomorphines. *Monatsh.Chem.* **2009**, *140*, 473-478

Sipos, A., Müller, F.K.U., Lehmann, J., Berényi, S., Antus, S.: Synthesis and pharmacological evaluation of thiazole and isothiazole derived apomorphines. *Arch.Pharm.* **2009**, *342*, 557-568

Schulze, M., Müller, F.K.U., Mason, J.M., Görls, H., Lehmann, J., Enzensperger, C.: Dibenzazecine scaffold rebuilding – is the flexibility always essential for high dopamine receptor affinities? *Borg.Med.Chem.* **2009**, *17*, 6898-6907

Poster

Müller, F.K.U., Enzensperger, C.: Ring expansion of azecine-type dopamine receptor ligands modulates the binding profile. *DPhG Jahrestagung*, Erlangen **2007**

Müller, F.K.U., Schulze, M., Enzensperger, C., Lehmann, J.: Scaffold modifications of dibenzazecines – increase of flexibility does not always enhance the affinities for dopamine receptors. *4th Summer School Medicinal Chemistry*, Regensburg **2008**

Müller, F.K.U., Enzensperger, C., Kassack, M., Lehmann, J.: Cross-target SARs: Azecine-styled dopamine receptor antagonists as ligands for serotonin 5HT2A receptors. *DPhG Jahrestagung*, Jena **2009**

Hiermit erkläre ich,

dass mir die geltende Promotionsordnung der Fakultät bekannt ist.

Die vorliegende Arbeit wurde von mir selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt.

Ich habe weder die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen, noch haben Dritte von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten, die mit dem Inhalt meiner Dissertation im Zusammenhang stehen, erhalten.

Die Arbeit wurde ausschließlich an der Friedrich-Schiller-Universität Jena eingereicht.

Jena, 16. August 2010

Franziska Katrin Ursula Müller

Geburtsdatum: 29. November 1978
Geburtsort: Jena
Familienstand: ledig

Schulbildung

09/1985 – 06/1991 Grundschohle: Hans-Marchwitza-Oberschohle in Dahlewitz
08/1991 – 06/1998 Weiterführende Schule: Fontane-Gymnasium in Rangsdorf, Abitur

Dienst:

10/1998 – 09/1999 Freiwilliges ökologisches Jahr im Biogarten Prieros – Informationszentrum für Naturkunde, Ökologie und Umweltschutz in Prieros

Hochschulbildung:

10/1999 – 04/2004 Studium der Pharmazie an der Friedrich-Schiller-Universität in Jena

Praktische Ausbildung:

08/2000 – 09/2000 und 02/2000 – 03/2000
Famulatur Käthe-Kollwitz-Apotheke in Blankenfelde
05/2004 – 10/2004 Jenapharm GmbH & Co. KG in Jena
Forschungsabteilung: Galenische Entwicklung – Transdermalia
11/2004 – 05/2005 Apotheke am Nollendorfer Hof in Jena
06/2005 Pharmazeutische Prüfung (Approbation als Apotheker 07/2005)

Wissenschaftliche Tätigkeit:

10/2003 – 12/2003 Studentische Hilfskraft an der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Institut für Pharmazie
Seit 09/2005 Doktorand im Arbeitskreis Lehmann, Bearbeitung des Themas „Neue Liganden an humanen Dopamin- und Serotoninrezeptoren – Assay Entwicklung und Struktur-Wirkungs-Beziehungen“
09/2005 – 03/2006 Wissenschaftliche Hilfskraft an der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Institut für Pharmazie
Seit 04/2006 Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Institut für Pharmazie
07/2007 – 12/2008 stellvertretender Projektleiter
Seit 01/2009 Projektleiter nach Gentechnikgesetz für die gentechnische Anlage des Lehrstuhls für Pharmazeutische und Medizinische Chemie der Friedrich-Schiller-Universität Jena

ANHANG

Code	D ₂ /D ₁	D ₅ /D ₁	D ₁ /5-HT _{2A}	D ₂ /5-HT _{2A}
WW84	85,63	0,18	0,99	84,57
CE551	80,67	0,71	0,39	31,81
LE404	44,49	3,81	0,59	26,32
CE521	37,37	0,99	1,81	67,76
CE501	29,39	2,35	2,64	77,68
PM153	28,89	0,82	0,48	13,84
PM124	27,50	0,59	1,06	29,14
PM145	21,72	1,53	1,15	24,95
PM78	21,19	1,87	0,52	11,10
CE550	17,07	0,12	2,32	39,68
FS3	14,26	1,16	3,78	53,94
LE410	12,56	2,49	1,32	16,52
MI506	11,48	2,62	0,12	1,41
PM58	11,34	0,75	1,66	18,84
PM92	10,89	0,22	2,32	25,23
PM148	9,66	0,54	1,69	16,37
LE301	9,04	0,41	98,25	887,72
CE5A0	7,91	7,91	0,29	2,28
CE590	7,32	1,31	1,07	7,82
CE560	6,58	0,53	140,22	922,83
CE571	6,40	4,21	5,74	36,75
PM103	6,33	0,00	0,53	3,34
CE570	6,00	0,32	3,79	22,72
PM77	5,95	5,80	5,90	35,10
CE5A1	4,83	0,87	0,21	1,00
PM83	4,82	0,13	0,71	3,43
CE591	4,77	0,63	0,68	3,24
WW60	4,45	0,05	5,44	24,22
PM98	4,01	24,35	0,14	0,55
PM130	3,46	1,19	0,83	2,88
LE300	3,20	0,41	21,99	70,33
PM22b	2,74	0,37	1,91	5,22
CE523	2,18	2,03	3,06	6,67
PM147	2,13	3,91	0,72	1,54
CE510	1,72	0,85	2,53	4,35
CE500	1,50	2,40	12,06	18,06
PM22-3	1,20	0,72	12,53	15,07
PM65a	1,11	6,00	2,80	3,12
SM	0,90	0,10	92,91	83,88
CE520	0,83	2,25	5,74	4,75
CE530	0,82	0,46	9,81	8,03
PM40	0,76	0,28	3,56	2,69
PM154	0,69	2,38	13,72	9,42
PM155	0,64	1,54	5,71	3,63
PM20	0,56	2,31	5,28	2,94
CE531	0,55	0,88	9,40	5,21
CE580	0,41	0,63	30,84	12,65
PM53	0,35	0,34	3,86	1,37
CE541	0,09	0,91	3,87	0,36
FM7	0,07	0,18	5,06	0,35

	Affinitätsunterschied geringer als eine Zehnerpotenz
	Affinitätsunterschied mindestens eine Zehnerpotenz und mehr

Tabelle 1 Selektivitäten der Indolo- und Dibenzazecine und deren Homologen in der Reihenfolge ihrer D₂/D₁ Selektivität

ANHANG

Code	D ₂ /D ₁	D ₅ /D ₁	D ₁ /5-HT _{2A}	D ₂ /5-HT _{2A}
PM98	4,01	24,35	0,14	0,55
CE5A0	7,91	7,91	0,29	2,28
PM65a	1,11	6,00	2,80	3,12
PM77	5,95	5,80	5,90	35,10
CE571	6,40	4,21	5,74	36,75
PM147	2,13	3,91	0,72	1,54
LE404	44,49	3,81	0,59	26,32
MI506	11,48	2,62	0,12	1,41
LE410	12,56	2,49	1,32	16,52
CE500	1,50	2,40	12,06	18,06
PM154	0,69	2,38	13,72	9,42
CE501	29,39	2,35	2,64	77,68
PM20	0,56	2,31	5,28	2,94
CE520	0,83	2,25	5,74	4,75
CE523	2,18	2,03	3,06	6,67
PM78	21,19	1,87	0,52	11,10
PM155	0,64	1,54	5,71	3,63
PM145	21,72	1,53	1,15	24,95
CE590	7,32	1,31	1,07	7,82
PM130	3,46	1,19	0,83	2,88
FS3	14,26	1,16	3,78	53,94
CE521	37,37	0,99	1,81	67,76
CE541	0,09	0,91	3,87	0,36
CE531	0,55	0,88	9,40	5,21
CE5A1	4,83	0,87	0,21	1,00
CE510	1,72	0,85	2,53	4,35
PM153	28,89	0,82	0,48	13,84
PM58	11,34	0,75	1,66	18,84
PM22-3	1,20	0,72	12,53	15,07
CE551	80,67	0,71	0,39	31,81
CE591	4,77	0,63	0,68	3,24
CE580	0,41	0,63	30,84	12,65
PM124	27,50	0,59	1,06	29,14
PM148	9,66	0,54	1,69	16,37
CE560	6,58	0,53	140,22	922,83
CE530	0,82	0,46	9,81	8,03
LE300	3,20	0,41	21,99	70,33
LE301	9,04	0,41	98,25	887,72
PM22b	2,74	0,37	1,91	5,22
PM53	0,35	0,34	3,86	1,37
CE570	6,00	0,32	3,79	22,72
PM40	0,76	0,28	3,56	2,69
PM92	10,89	0,22	2,32	25,23
FM7	0,07	0,18	5,06	0,35
WW84	85,63	0,18	0,99	84,57
PM83	4,82	0,13	0,71	3,43
CE550	17,07	0,12	2,32	39,68
SM	0,90	0,10	92,91	83,88
WW60	4,45	0,05	5,44	24,22
PM103	6,33	n.b.	0,53	3,34

	Affinitätsunterschied geringer als eine Zehnerpotenz
	Affinitätsunterschied mindestens eine Zehnerpotenz und mehr

Tabelle 2 Selektivitäten der Indolo- und Dibenzazecine und deren Homologen in der Reihenfolge ihrer D₅/D₁ Selektivität

ANHANG

Code	D ₂ /D ₁	D ₅ /D ₁	D ₁ /5-HT _{2A}	D ₂ /5-HT _{2A}
CE560	6,58	0,53	140,22	922,83
LE301	9,04	0,41	98,25	887,72
SM	0,90	0,10	92,91	83,88
CE580	0,41	0,63	30,84	12,65
LE300	3,20	0,41	21,99	70,33
PM154	0,69	2,38	13,72	9,42
PM22-3	1,20	0,72	12,53	15,07
CE500	1,50	2,40	12,06	18,06
CE530	0,82	0,46	9,81	8,03
CE531	0,55	0,88	9,40	5,21
PM77	5,95	5,80	5,90	35,10
CE571	6,40	4,21	5,74	36,75
CE520	0,83	2,25	5,74	4,75
PM155	0,64	1,54	5,71	3,63
WW60	4,45	0,05	5,44	24,22
PM20	0,56	2,31	5,28	2,94
FM7	0,07	0,18	5,06	0,35
CE541	0,09	0,91	3,87	0,36
PM53	0,35	0,34	3,86	1,37
CE570	6,00	0,32	3,79	22,72
FS3	14,26	1,16	3,78	53,94
PM40	0,76	0,28	3,56	2,69
CE523	2,18	2,03	3,06	6,67
PM65a	1,11	6,00	2,80	3,12
CE501	29,39	2,35	2,64	77,68
CE510	1,72	0,85	2,53	4,35
CE550	17,07	0,12	2,32	39,68
PM92	10,89	0,22	2,32	25,23
PM22b	2,74	0,37	1,91	5,22
CE521	37,37	0,99	1,81	67,76
PM148	9,66	0,54	1,69	16,37
PM58	11,34	0,75	1,66	18,84
LE410	12,56	2,49	1,32	16,52
PM145	21,72	1,53	1,15	24,95
CE590	7,32	1,31	1,07	7,82
PM124	27,50	0,59	1,06	29,14
WW84	85,63	0,18	0,99	84,57
PM130	3,46	1,19	0,83	2,88
PM147	2,13	3,91	0,72	1,54
PM83	4,82	0,13	0,71	3,43
CE591	4,77	0,63	0,68	3,24
LE404	44,49	3,81	0,59	26,32
PM103	6,33	n.b.	0,53	3,34
PM78	21,19	1,87	0,52	11,10
PM153	28,89	0,82	0,48	13,84
CE551	80,67	0,71	0,39	31,81
CE5A0	7,91	7,91	0,29	2,28
CE5A1	4,83	0,87	0,21	1,00
PM98	4,01	24,35	0,14	0,55
MI506	11,48	2,62	0,12	1,41

	Affinitätsunterschied geringer als eine Zehnerpotenz
	Affinitätsunterschied mindestens eine Zehnerpotenz und mehr

Tabelle 3 Selektivitäten der Indolo- und Dibenzazecine und deren Homologen in der Reihenfolge ihrer D₁/5-HT_{2A} Selektivität

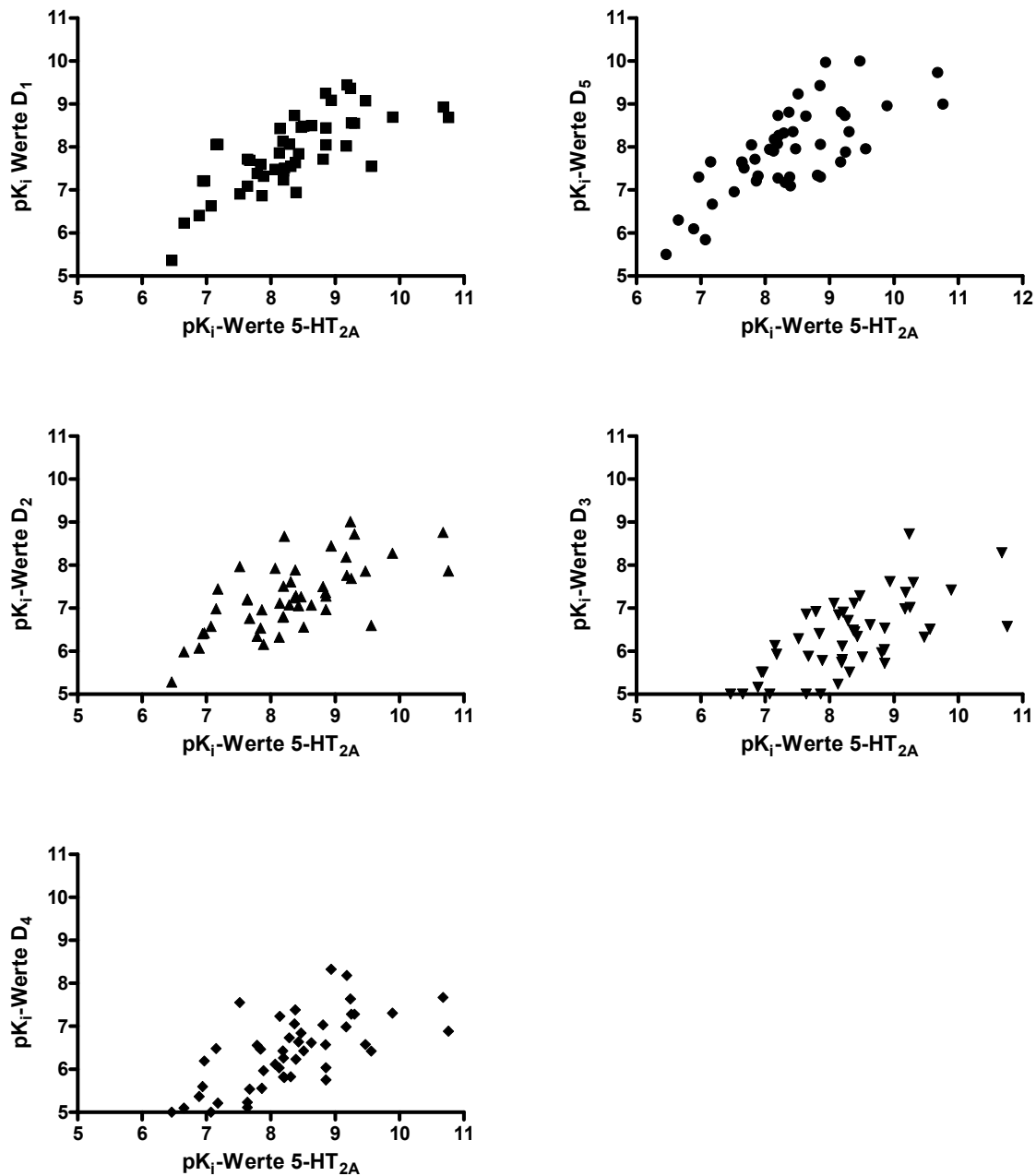
ANHANG

Code	D ₂ /D ₁	D ₅ /D ₁	D ₁ /5-HT _{2A}	D ₂ /5-HT _{2A}
CE560	6,58	0,53	140,22	922,83
LE301	9,04	0,41	98,25	887,72
WW84	85,63	0,18	0,99	84,57
SM	0,90	0,10	92,91	83,88
CE501	29,39	2,35	2,64	77,68
LE300	3,20	0,41	21,99	70,33
CE521	37,37	0,99	1,81	67,76
FS3	14,26	1,16	3,78	53,94
CE550	17,07	0,12	2,32	39,68
CE571	6,40	4,21	5,74	36,75
PM77	5,95	5,80	5,90	35,10
CE551	80,67	0,71	0,39	31,81
PM124	27,50	0,59	1,06	29,14
LE404	44,49	3,81	0,59	26,32
PM92	10,89	0,22	2,32	25,23
PM145	21,72	1,53	1,15	24,95
WW60	4,45	0,05	5,44	24,22
CE570	6,00	0,32	3,79	22,72
PM58	11,34	0,75	1,66	18,84
CE500	1,50	2,40	12,06	18,06
LE410	12,56	2,49	1,32	16,52
PM148	9,66	0,54	1,69	16,37
PM22-3	1,20	0,72	12,53	15,07
PM153	28,89	0,82	0,48	13,84
CE580	0,41	0,63	30,84	12,65
PM78	21,19	1,87	0,52	11,10
PM154	0,69	2,38	13,72	9,42
CE530	0,82	0,46	9,81	8,03
CE590	7,32	1,31	1,07	7,82
CE523	2,18	2,03	3,06	6,67
PM22b	2,74	0,37	1,91	5,22
CE531	0,55	0,88	9,40	5,21
CE520	0,83	2,25	5,74	4,75
CE510	1,72	0,85	2,53	4,35
PM155	0,64	1,54	5,71	3,63
PM83	4,82	0,13	0,71	3,43
PM103	6,33	0,00	0,53	3,34
CE591	4,77	0,63	0,68	3,24
PM65a	1,11	6,00	2,80	3,12
PM20	0,56	2,31	5,28	2,94
PM130	3,46	1,19	0,83	2,88
PM40	0,76	0,28	3,56	2,69
CE5A0	7,91	7,91	0,29	2,28
PM147	2,13	3,91	0,72	1,54
MI506	11,48	2,62	0,12	1,41
PM53	0,35	0,34	3,86	1,37
CE5A1	4,83	0,87	0,21	1,00
PM98	4,01	24,35	0,14	0,55
CE541	0,09	0,91	3,87	0,36
FM7	0,07	0,18	5,06	0,35

	Affinitätsunterschied geringer als eine Zehnerpotenz
	Affinitätsunterschied mindestens eine Zehnerpotenz und mehr

Tabelle 4 Selektivitäten der Indolo- und Dibenzazecine und deren Homologen in der Reihenfolge ihrer D₂/5-HT_{2A} Selektivität

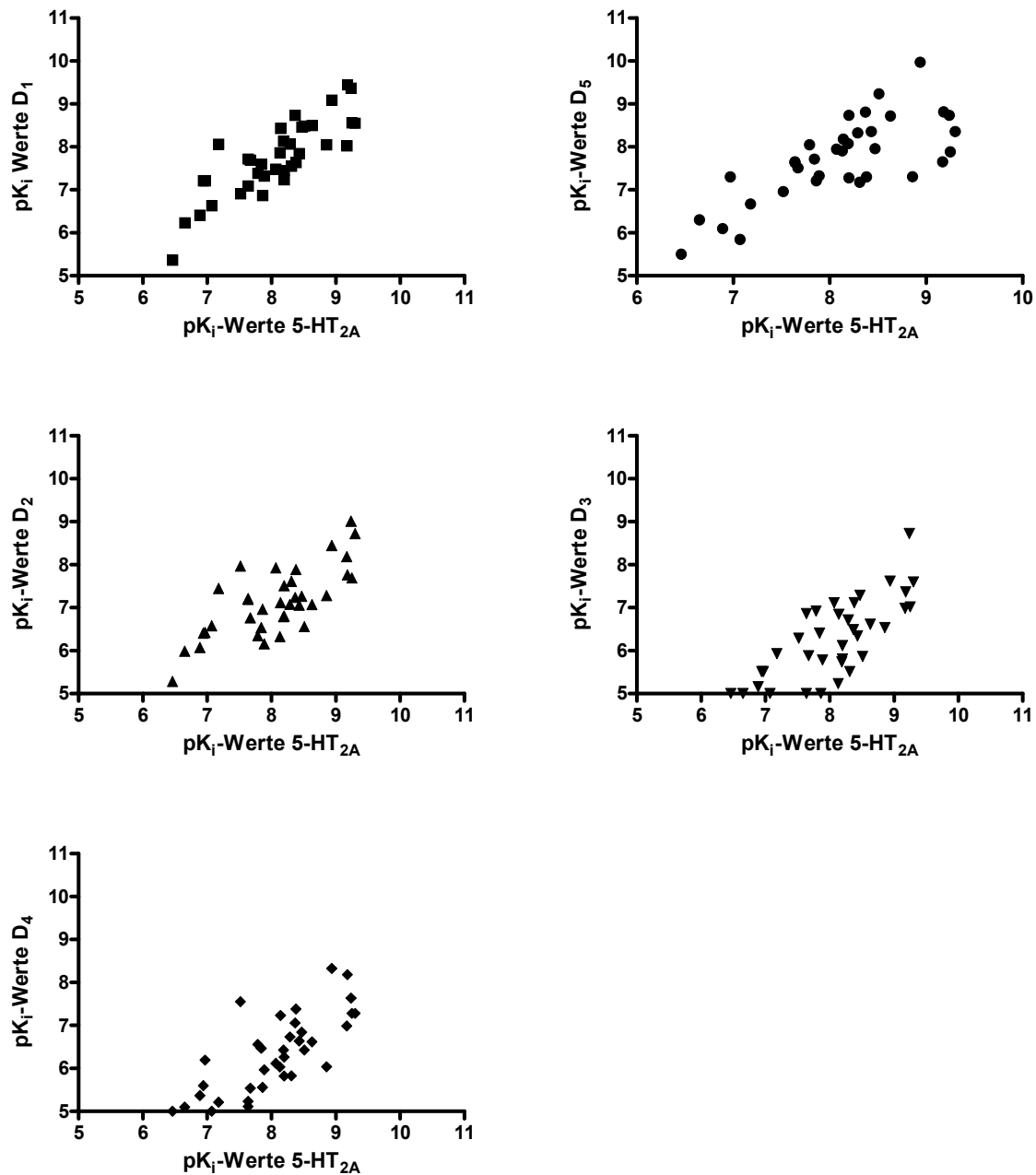
Korrelationsanalysen aller untersuchten Azecinderivate mit mindestens submikromolarer 5-HT_{2A} Affinität



Parameter	5-HT2A/D1	5-HT2A/D2	5-HT2A/D3	5-HT2A/D4	5-HT2A/D5
Number of XY Pairs	47	47	47	47	46
Pearson r	0.7438	0.6715	0.6604	0.6639	0.7398
95% confidence interval	0.5805 to 0.8495	0.4761 to 0.8037	0.4605 to 0.7965	0.4654 to 0.7988	0.5724 to 0.8480
P value (two-tailed)	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001
P value summary	***	***	***	***	***
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
R squared	0.5532	0.4509	0.4361	0.4408	0.5473

Abbildung 1 5-HT_{2A} Affinitäten der Azecinderivate in Korrelation zu den Dopaminrezeptoraffinitäten (es wurden nur Verbindungen mit submikromolarer und besserer Affinität am 5-HT_{2A} Rezeptor berücksichtigt, ohne PM22b, CE5A0 und CE5A1)

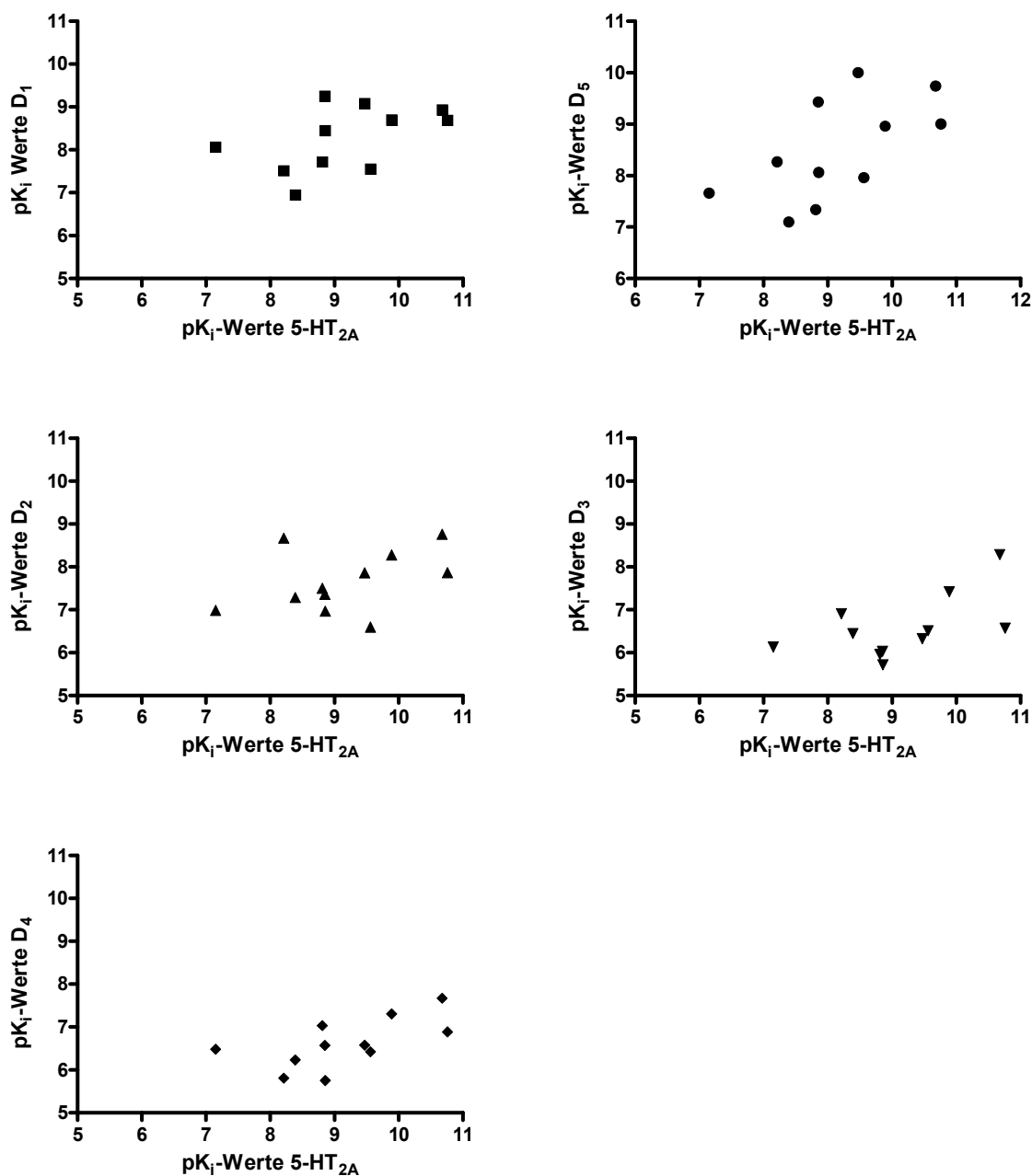
Korrelationsanalysen der Dibenzderivate mit mindestens submikromolarer 5-HT_{2A} Affinität



Parameter	5-HT2A/D1	5-HT2A/D2	5-HT2A/D3	5-HT2A/D4	5-HT2A/D5
Number of XY Pairs	36	36	36	36	35
Pearson r	0.8381	0.7377	0.7469	0.7526	0.7497
95% confidence interval	0.7031 to 0.9147	0.5399 to 0.8582	0.5544 to 0.8636	0.5632 to 0.8668	0.5551 to 0.8665
P value (two-tailed)	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001
P value summary	***	***	***	***	***
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
R squared	0.7023	0.5441	0.5579	0.5663	0.5621

Abbildung 2 5-HT_{2A} Affinitäten der Dibenzderivate in Korrelation mit den Dopaminrezeptoraffinitäten (es wurden nur Verbindungen mit submikromolarer und besserer Affinität am 5-HT_{2A} Rezeptor berücksichtigt, ohne PM22b, CE5A0 und CE5A1)

Korrelationsanalysen der Indoloderivate



Parameter	5-HT2A/D1	5-HT2A/D2	5-HT2A/D3	5-HT2A/D4	5-HT2A/D5
Number of XY Pairs	11	11	11	11	11
Pearson r	0.4904	0.4119	0.5586	0.6226	0.6169
95% confidence interval	-0.1553 to 0.8425	-0.2498 to 0.8114	-0.06224 to 0.8676	0.03616 to 0.8901	0.02679 to 0.8881
P value (two-tailed)	0.1257	0.2081	0.0741	0.0408	0.0432
P value summary	ns	ns	ns	*	*
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	No	No	No	Yes	Yes
R squared	0.2404	0.1697	0.3120	0.3877	0.3805

Abbildung 3 5-HT_{2A} Affinitäten der Indoloderivate in Korrelation mit den Dopaminrezeptoraffinitäten